

Le Dosage des sels biliaires
dans la Bile
et le Liquide duodénal

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ de PARIS
(Pharmacie)

Présentée et soutenue en Juin 1930

PAR

LOUIS CUNY

PHARMACIEN LAURÉAT DE LA FACULTÉ
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS
ANCIEN PRÉPARATEUR AU LABORATOIRE NATIONAL
DE CONTRÔLE DES MÉDICAMENTS
LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

Jury { MM. GRIMBERT, Président
— SOMMELET, Professeur
— FLEURY, Agrégé



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Le Dosage des sels biliaires
dans la Bile
et le Liquide duodénal

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ de PARIS
(Pharmacie)

Présentée et soutenue en Juin 1930

PAR

LOUIS CUNY

PHARMACIEN LAURÉAT DE LA FACULTÉ
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS
ANCIEN PRÉPARATEUR AU LABORATOIRE NATIONAL
DE CONTRÔLE DES MÉDICAMENTS
LICENCIÉ ÈS-SCIENCES

Jury { MM. GRIMBERT, Président
— SOMMELET, Professeur
— FLEURY, Agrégé.

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION



MM. RADAIS, *Doyen*, O. ✱, Q I.
PERROT, *Assesseur*, O. ✱, Q I.
G. DURSENT, *Secrétaire*, ✱, Q I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. ✱, Q I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. ✱, Q I.	Chimie organique.
PERROT, O. ✱, Q I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, O. ✱, Q I.	Zoologie.
GRIMBERT, ✱, Q I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. ✱, Q I.	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O. ✱, Q I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ✱, Q I.	Toxicologie.
BOUGAULT, ✱, Q I.	Chimie analytique.
GORIS, ✱, Q I.	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, ✱, Q I.	Botanique générale.
TASSILLY, ✱, Q I.	Physique.
DAMIENS, ✱, Q I.	Chimie minérale.

Professeur honoraire : M. A. VILLIERS, ✱, Q I.

CHARGÉS DE COURS

MM. SOMMELET, ✱, Q I.	Minéralogie.
Marc HONNORAT, ✱, Q I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, ✱, Q I.	Cryptogamie.
LAUNOY, O. ✱, Q I.	Pharmacodynamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ✱, Q I.	MM. PICON, Q I.
LUTZ, ✱, Q I.	FABRE, Q A.
LAUNOY, O. ✱, Q I.	MASCRÉ, Q I.
HÉRISSEY, O. ✱, Q I.	FLEURY, Q I.
DELABY, ✱, Q A.	BACH, Q I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ✱, Q I.	Chimie générale.
FABRE, Q A. , FLEURY, Q I. , <i>agrégés</i>	chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGES, Q I.	Micrographie.
LEROUX, Q I.	Physique.
DEVAL, Q I.	Microbiologie.
HÉRISSEY, ✱, Q I. , DELABY, ✱, Q A. , et PICON, Q I. , <i>agrégés</i>	chargés des travaux généraux de 4 ^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, Q I.

A Monsieur le Professeur L. GRIMBERT

Membre de l'Académie de Médecine
Professeur à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien honoraire des Hôpitaux

Respectueux hommage.

A Monsieur le Docteur M. CHIRAY

Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine
Médecin des Hôpitaux

En témoignage d'entier dévouement.

Le dosage des sels biliaires dans la bile et le liquide duodénal

INTRODUCTION

C'est à l'instigation de M. Chiray que nous avons étudié le dosage des sels biliaires dans la bile et dans le liquide de tubage duodénal. Alors que les autres composés importants qui les y accompagnent, cholestérol et pigments, pouvaient être aisément évalués avec une approximation suffisante, il ne semblait pas en être de même de ces sels, dont le physiologiste et le clinicien auraient cependant intérêt, pour leurs recherches sur la fonction biliaire et ses troubles, à déterminer le taux. Nous avons été ainsi conduit à passer en revue les méthodes proposées et à modifier plus ou moins profondément certaines d'entre elles.

Ces méthodes étant éparses dans des publications de chimie biologique et de médecine, le plus souvent étrangères, il nous a paru opportun de les rassembler et même parfois de les décrire avec quelque détail. N'ayant pu tirer parti d'un travail d'ensemble sur ce dosage, nous avons tenté de l'écrire, sans d'ailleurs nous dissimuler ses imperfections et ses lacunes; nous n'eussions pu combler ces dernières qu'en donnant à ce mémoire une ampleur excessive. Du moins pensons-nous faciliter ainsi des progrès ultérieurs. Cette même considération nous a amené à joindre à notre étude quelques chapitres préliminaires.

*
* *

Nous avons envisagé tout d'abord l'état actuel de nos connaissances d'ordre chimique sur les acides biliaires; elles se sont remarquablement accrues depuis une dizaine d'années, et les manuels classiques n'en fournissent qu'un exposé très sommaire. Abstraction faite des applications analytiques que pourraient éventuellement comporter certaines de ces acquisitions récentes, et quand bien même celles-ci garderaient encore un caractère purement théorique, il convient sans doute de préciser la nature des substances à doser et de les situer dans le cadre de la chimie organique. Aussi avons-nous reproduit ici, comme on nous l'a

conseillé, et non sans la compléter sur plusieurs points, une partie de la revue générale que nous avons publiée sur ce sujet, pour la première fois, semble-t-il, en langue française.

Il est toujours utile, en outre, avant de chercher à doser, dans un milieu organique complexe, l'un quelconque de ses constituants, de tenir compte de la composition habituelle de ce milieu, en prévision de l'intervention possible des autres substances présentes. Aussi nous sommes-nous mis en quête d'indications sur la composition des biles animales et de la bile humaine, d'après les résultats obtenus par divers auteurs.

Ayant dû préparer, pour nos essais de dosage, différents acides ou sels biliaires, nous rappellerons les techniques mises en œuvre à cette occasion.

En conséquence, la première partie de ce travail comprendra trois chapitres, respectivement consacrés aux trois questions que nous venons d'évoquer.

*
* *

Dans la seconde partie, les méthodes de dosage sont classées d'après le principe qui leur sert de base, à savoir :

- 1° L'isolement et la pesée des acides biliaires (Chap. I);
- 2° La mesure des variations de la tension superficielle (Chap. II);
- 3° L'hydrolyse alcaline des sels biliaires, suivie du dosage des amino-acides libérés, ces derniers pouvant être évalués, soit par gazométrie (Chap. III), soit par colorimétrie (Chap. IV), soit par volumétrie (Chap. V);
- 4° La production d'une réaction colorée (Chap. VI);
- 5° Le dosage du soufre des sels biliaires sulfurés (Chap. VII);
- 6° Le titrage acidimétrique ou polarimétrique de l'acide cholalique (Chap. VIII).

Les chapitres I, II et VIII sont surtout documentaires, tandis que dans les autres figurent des expériences personnelles nous ayant permis d'établir de nouvelles techniques. Nous nous sommes particulièrement occupé des procédés utilisant l'hydrolyse alcaline, en raison du contrôle qu'apportait le dosage de l'azote aminé par des méthodes très différentes. La technique gazométrique de Van Slyke a été ainsi rendue d'application beaucoup plus aisée, tandis

que nous cherchions à réaliser également le dosage de l'azote aminé à l'aide de la ninhydrine et par formol-titration.

La nécessité d'un mode opératoire simple et rapide pour l'examen à l'hôpital des liquides de tubage, nous a fait étudier assez longuement une méthode colorimétrique. Soit en vue d'expériences de physiologie, portant d'ordinaire sur le Chien, soit pour évaluer comparativement les sels biliaires sulfurés et non sulfurés, il nous a paru utile que le dosage du soufre biliaire par la méthode à la benzidine fût décrit dans un chapitre spécial.

Chaque série d'essais est précédée de quelques renseignements sur les réactions employées; indépendamment de l'usage que nous en faisons en l'occurrence, on aura vraisemblablement avantage à trouver des indications et des références sur certaines de ces réactions et sur les méthodes qui en dérivent, telles que la méthode de van Slyke, la réaction à la ninhydrine, la réaction de Pettenkofer.

Nous avons enfin placé, en appendice, des tables de calcul pour les dosages gazométriques, évitant de recourir aux formules eudiométriques, quelques observations sur la formol-titration du glycocolle et de la taurine et une récapitulation de nos résultats d'analyses de biles animales.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à M. le Professeur Grimbert, qui nous a fait l'honneur de nous admettre parmi ses élèves et de présider à la soutenance de cette thèse.

Après nous avoir ouvert, dès le début de nos études, l'accès de son laboratoire, M. Sommelet nous a constamment aidé, par la suite, de ses conseils. Nous le remercions d'avoir consenti à faire partie de notre jury et l'assurons de notre respectueux attachement.

A. M. le Docteur Chiray, qui nous a suggéré le sujet de ce mémoire, et a mis à notre disposition les ressources de son service d'hôpital, nous adressons nos bien vifs remerciements.

Nous gardons une profonde gratitude à M. Fleury, pour l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à nos recherches. Si ces dernières ont pu constituer un travail d'ensemble, c'est à ses encouragements que nous le devons.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

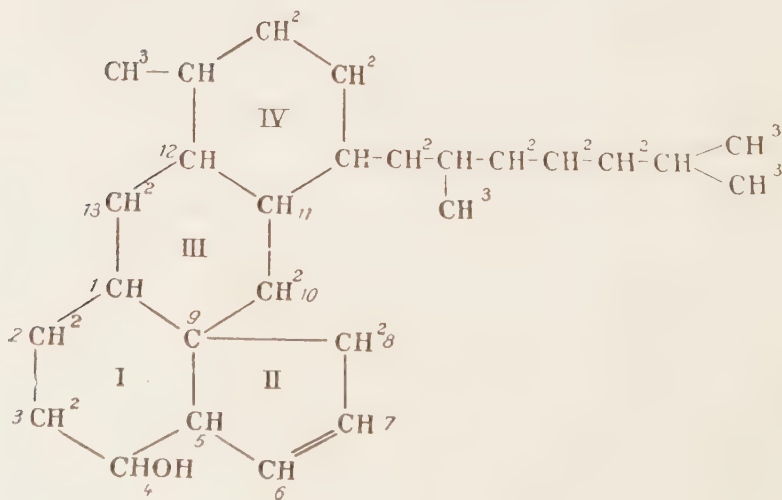
LA CHIMIE DES ACIDES BILIAIRES

Sur le conseil qu'on nous en a donné, nous reproduisons ici avec quelques modifications et additions une partie de la revue générale [72] que nous avons publiée en 1928 sur la constitution moléculaire du cholestérol et la chimie des acides biliaires. Nous avons en effet jugé opportun d'exposer sommairement l'état actuel de nos connaissances en ce domaine, et en tirant d'ailleurs grand parti des monographies de Windaus [326], Hammarsten [133] et Borsche [33]. Presque simultanément est parue une revue analogue de Grigaut [120], intitulée : « Du cholestérol aux acides biliaires ».

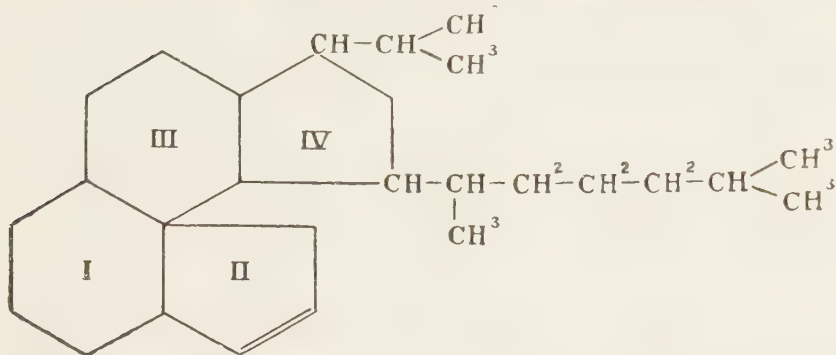
Nous renvoyons à ces deux revues pour ce qui concerne le cholestérol, le coprostérol et les carbures correspondants, en rappelant toutefois les formules attribuées à ces composés, car c'est sur elles que repose toute la chimie des acides biliaires.

Formule développée du cholestérol

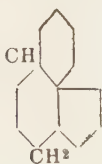
Formule de Windaus



Formule de Wieland, Schlichting et Jacobi [320] (1)



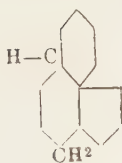
Formules du coprostérol, du pseudocoprostérol, de l'allocholestérol et des carbures correspondants (2)



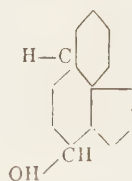
Pseudocholestane.
(coprostérol)



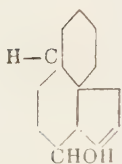
Coprostérol.



Cholestane.



Pseudocoprosterol
(E. cholestanol)



Cholestérol.



ou



Allo-cholestérol.

(1) La structure du noyau IV a été étudiée de nouveau récemment par Wieland et Vocke [322].

Il n'y a pas lieu de retenir ici la formule terpénique de Vernon Steile et Kahlenberg [293].

(2) Ces formules diffèrent de celles de Windaus [326], reproduites par Grigaut [120], dans lesquelles l'isomérisie entre le cholestane et le pseudocholestane tient à la position dans l'espace de l'atome d'H lié au carbone 4. Dans un travail plus récent [335], auquel nos schémas sont empruntés, Windaus situe en 1 ce carbone asymétrique.

I. CLASSIFICATION DES ACIDES BILIAIRES

Ces acides sont classés d'habitude suivant leur origine, ou encore d'après la présence ou l'absence de soufre dans leur molécule. Quoique les auteurs allemands ne semblent pas l'avoir fait, nous pensons qu'une classification nouvelle peut être proposée, afin de montrer dès maintenant les modifications apportées dans ces derniers temps aux données classiques. Les acides biliaires se laissent ainsi distribuer en groupes d'importance très inégale.

A) *Série cholalique*. — On placera ici les deux acides les plus connus: l'acide glycocholique $C^{26}H^{11}NO^6$, retiré surtout de la bile du bœuf (1), et l'acide taurocholique $C^{26}H^{11}NSO^7$, dont la source principale est la bile du chien (2). Ils se rencontrent également chez l'homme, le mouton, les serpents, divers poissons, etc. On sait qu'ils sont formés d'une molécule d'acide cholalique $C^{24}H^{10}O^7$ et d'une molécule de glyocolle ou de taurine, et que leur hydrolyse, aisément obtenue, sépare l'acide cholalique et l'acide cholique. Inversement, Bondi et Muller [29] en ont réalisé la synthèse, en faisant agir l'azide de l'acide cholalique sur le glyocolle ou la taurine.

B) *Série désoxycholique*. — a) Aux acides précédents on associe couramment les acides choléniques. C'est ainsi, par exemple, que dans la bile du bœuf ou la bile humaine, l'acide glycocholique est accompagné de l'acide glycholénique $C^{26}H^{13}NO^5$ de Walgrenn [299], tandis que l'acide taurocholénique $C^{26}H^{13}NSO^6$ de Gulbring [122], est associé dans la bile du chien à l'acide taurocholique. Le glyocolle et la taurine sont ainsi copulés à un acide cholénique (Latschinoff [169], qui posséderait d'autre part un isomère, l'acide désoxycholique de Mylius [206]. Cette conception, que reproduisent la plupart des manuels, a été profondément modifiée par les travaux de Wieland et Sorge [304], qui ont montré que cet acide cholénique n'est qu'un produit d'addition de huit molécules d'acide désoxycholique et d'une molécule d'acide stéarique, palmitique ou oléique. Cette combinaison est d'ailleurs très stable et l'hydrolyse des acides biliaires correspondants libère l'acide sans détacher l'acide désoxycholique de la copule grasse. La soudure de ces deux éléments a été obtenue *in vitro*, de même qu'ont été préparés des

(1) Appelé autrefois acide cholique, dénomination appliquée aujourd'hui à l'acide cholalique. Sous l'action de l'eau bouillante, l'acide glycocholique donne un isomère moins soluble, l'acide paraglycocholique de Strecker [279], qui a été étudié par plusieurs auteurs.

(2) Appelé autrefois acide choléique.

complexes analogues donnés par l'acide désoxycholique avec des corps variés : acide acétique et homologues supérieurs, phénol, xylol, camphre, acide benzoïque, salol, naphthaline, etc. (1). La formation de tels complexes explique sans doute la solubilisation, par la bile, de substances comme le cholestérol, les graisses, les alcaloïdes, dont l'absorption est ainsi facilitée. Soit par chauffage dans le vide, soit à l'aide du méthylate de sodium ou du xylol acétique, Wieland et Sorge ont dissocié l'acide choléinique en acide gras et acide désoxycholique. En faisant agir sur le glyco-colle et la taurine l'azide de ce dernier acide, Wieland et Stendier [305] ont préparé les acides glyco et taurodésoxycholique, mais sans pouvoir introduire dans la molécule l'acide gras que renferment les acides biliaires naturels. Ces acides de synthèse présentent avec ces derniers de nombreuses analogies, mais aussi quelques différences (point de fusion). Selon ces auteurs, il n'est d'ailleurs pas démontré que le mode de liaison entre l'acido-acide et l'acide désoxycholique soit le même dans les deux cas. L'acide désoxycholique a été trouvé ensuite par Schenck [263] dans la bile du mouton.

b) C'est également dans ce groupe qu'est venu récemment se ranger l'acide hyoglycocholique de la bile du porc (Gundelach et Strecker [123]), dans la formule duquel le glyco-colle serait adjoint à un acide hyocholalique. Ainsi que Jolin [157], Hammarsten distingue un acide α $C^{27}H^{13}NO^+$ et un acide β hyoglycocholique, de séparation difficile et dont les propriétés sont mal connues. En reprenant il y a quelques années l'étude de l'acide α , Windaus et Bohne [328] lui ont trouvé cette formule: $C^{26}H^{13}NO^+$ qui est identique à celle de l'acide glycodésoxycholique. L'hydrolyse donne du glyco-colle et l'acide hyodésoxycholique, isomère de l'acide désoxycholique, sur lequel nous reviendrons en raison de sa parenté avec le cholestérol. Il ne fournit pas de complexes du type choléinique. Nous rappellerons ici les très rares travaux français consacrés aux acides biliaires et qui sont dus à Piettre. Selon cet auteur [224], l'acide glycocholique de la bile du porc posséderait la formule $C^{27}H^{13}NO^+$; son hydrolyse conduit à un acide cholalique $C^{23}H^{11}O^+$ différent de celui qui donnent les taurocholates [226] (2).

(1) Ces combinaisons sont remarquablement stables et il est très difficile de débarrasser l'acide désoxycholique des solvants qu'il peut ainsi fixer (éther, acétone, etc.). La combinaison acétique est très précieuse pour la purification de cet acide.

(2) Le même chimiste a décrit en outre [225] un mode de traitement des diverses biles, pour l'extraction des acides biliaires.

c) Heintz et Wislicenus [137] ont isolé de la bile de l'oie un acide taurochénocolique décomposable en taurine et acide chénocolique. Dans un travail récent [329], Windaus, Böhne et Schwarzkopf ont montré qu'il s'agit d'un produit impur et que l'hydrolyse de la bile d'oie donne surtout l'acide chénodésoxycholique $C^{21}H^{40}O^4$, autre isomère de l'acide désoxycholique de la bile du bœuf; il existe aussi chez la poule (Windaus et Van Schoor) [333].

d) Un troisième isomère a été trouvé dans la bile humaine par Wieland et Reverey [317], qui l'ont appelé acide anthropodésoxycholique. La bile en renferme presque autant que d'acide désoxycholique lequel, soit dit en passant, peut être aussi abondant que l'acide cholalique lui-même. Le nouvel acide se distingue de ces derniers en ce qu'il donne avec intensité la réaction de Liebermann. Il s'est rapidement révélé identique à l'acide chénodésoxycholique de l'oie.

e) L'acide fellinique de Schotten [271] et de Lassar-Cohn [168], $C^{23}H^{40}O^4$, cité encore dans plusieurs ouvrages, n'a pu être extrait de nouveau. C'est probablement un acide choléinique impur.

C. *Série lithocholique*. — Elle ne compte qu'un représentant, l'acide lithocholique $C^{21}H^{38}O^3$ trouvé par Hans Fischer [89] dans les calculs biliaires, puis extrait de la bile humaine, où il existe en très faible quantité, par Wieland et Weyland [309].

D. *Série phococholique*. — Les acides α et β phocotaurocholiques $C^{26}H^{48}NSO^8$ et $C^{26}H^{48}NSO^7$ ont été retirés par Hammarsten [132] de la bile du morse et de quelques phoques; à ces composés correspondent les acides α et β phococholiques $C^{22}H^{36}O^7$ et $C^{24}H^{40}O^5$. L'étude de tous ces corps est à peine ébauchée; Windaus et van Schoor [336] ont récemment montré que l'acide β était un isomère de l'acide cholalique, dont un des oxyhydryles se trouve placé dans la chaîne latérale.

E. *Série des éthers du skymnol*. — La bile de certains plagiostomes, dont le requin, a fourni à Hammarsten [128] des acides particuliers, qui sont des éthers sulfuriques d'alcools voisins, semble-t-il, de l'acide cholalique et du cholestérol, l' α -skymnol $C^{27}H^{46}O^7$ et le β -skymnol $C^{29}H^{50}O^5$; ces substances sont très mal connues (1).

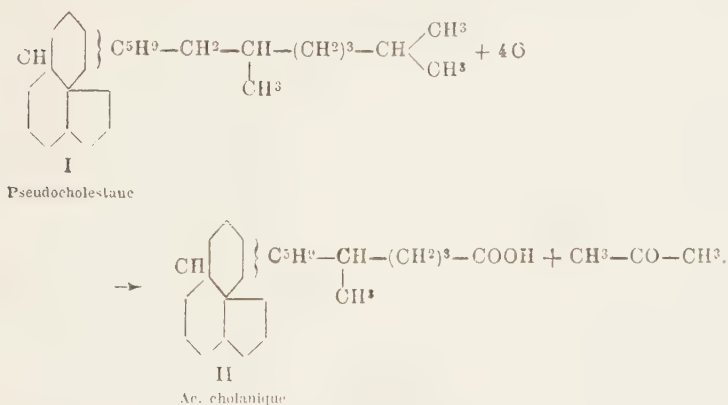
(1) Grigaut [120] range dans le groupe des acides biliaires la *bufotaline* extraite par Wieland et Alles [311] de la sécrétion cutanée du crapaud.

On n'a pu encore attribuer une formule développée à tous ces acides, mais seulement à l'acide cholalique, à l'acide désoxycholique et à ses isomères et à l'acide lithocholique.

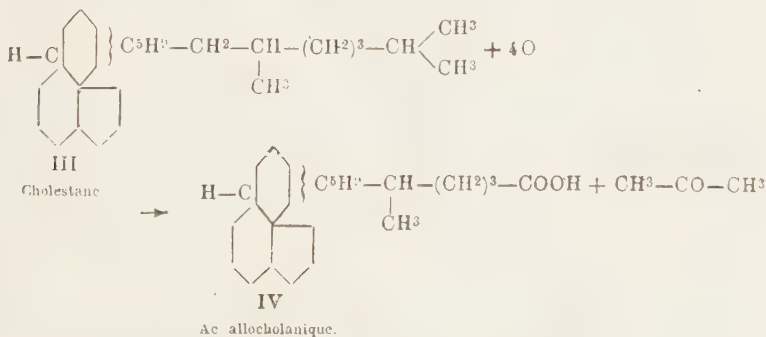
II. NOMENCLATURE ET FORMULES DES ACIDES BILIAIRES

A la base de cette nomenclature se trouve l'acide *cholanique*, dont les relations avec le cholestérol sont elles-mêmes évidentes

On obtient en effet cet acide II, soit, comme l'ont fait Windaus et Neukirchen [325], en oxydant le pseudo-cholestane I (ce qui libère une molécule d'acétone), soit en faisant disparaître par réduction les trois oxhydryles de l'acide cholalique (Wieland et Weil) [303]. Ce double mode d'obtention révèle la position intermédiaire, pour ainsi parler, qu'occupe l'acide cholanique entre le cholestérol et les acides biliaires (1).



(1) A l'oxydation du pseudocholestane correspond en outre celle du cholestane III ; elle donne un acide cholanique IV isomère du précédent, appelé tout d'abord par Windaus acide hyocholanique [327], puis allocholanique [334].



Selon cet auteur, l'isomérisie tient à l'arrangement stérique des valences du carbone 1. (Voir le numérotage de la formule du cholestérol.)

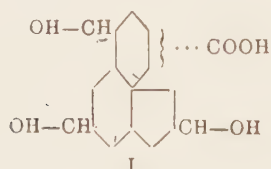
A l'acide cholanique se rattachent les acides biliaires étudiés, qui sont tous des acides alcools-secondaires, avec un unique carboxyle et de un à trois oxhydryles alcooliques :

L'acide cholalique I est l'acide trioxy-3-7-13-cholanique (1).

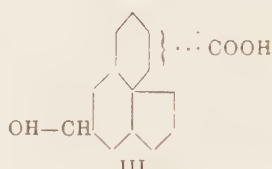
L'acide désoxycholique II est l'acide dioxy-3-7-cholanique

L'acide lithocholique III est l'acide oxy-3-cholanique.

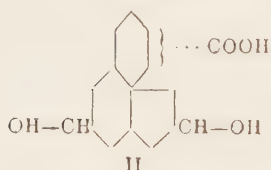
Les isomères de la série désoxycholique se distinguent par la position variable de l'un des deux oxhydryles; ces derniers sont placés en 3-13 dans l'acide hyodésoxycholique IV et en 3-12 dans l'acide chénodésoxycholique V, identique lui-même à l'acide anthropo-désoxycholique (2).



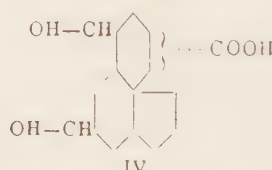
Ac. cholalique.



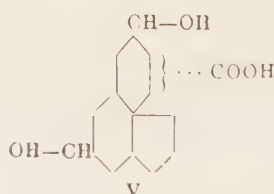
Ac. lithocholique



Ac. désoxycholique



Ac. hyodésoxycholique.



Ac. anthropo (chêno) désoxycholique

Toutes ces formules pourraient comporter en outre le quatrième noyau pentagonal dont Wieland et ses élèves [320] admettent l'existence, et qui figure dans la formule donnée plus haut au cholestérol (page 11).

(1) D'après un travail récent de Borsche et Frank [37], cité plus loin, l'acide cholalique serait l'acide trioxy-3-7-12 cholanique.

(2) De l'acide allocholanique du cholestane, Windaus a tout d'abord fait dériver l'acide hyodésoxycholique, qu'il a rangé par la suite [334] dans la série cholanique.

III. LES DÉRIVÉS DES ACIDES BILIAIRES

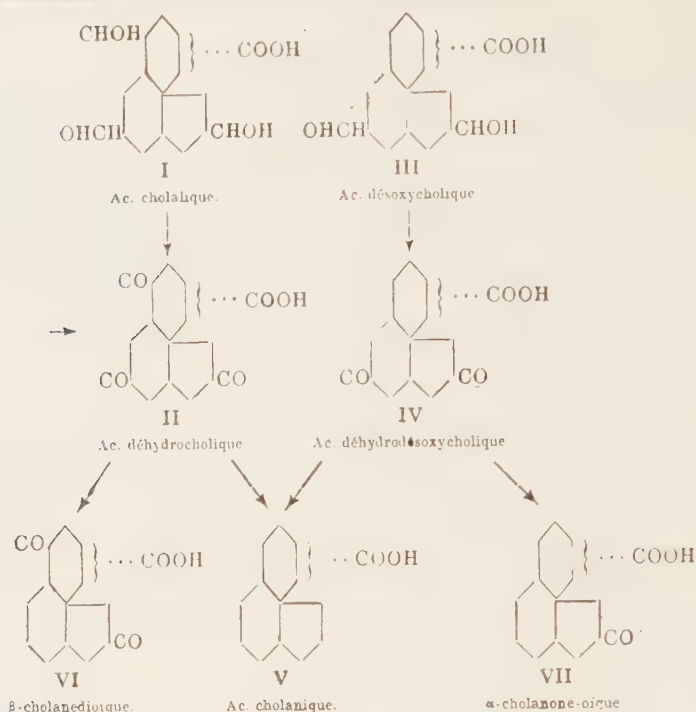
L'établissement de telles formules met en œuvre diverses méthodes plus ou moins générales, dont l'application systématique fournit de nombreux composés ; la possibilité d'obtenir ces derniers, et de leur faire subir quelque autre transformation, vient plaider en faveur d'une certaine architecture moléculaire. Il semble qu'en ce domaine l'abondance des « recoupements » soit particulièrement précieuse et vienne compenser, jusqu'à un certain point, le manque de méthodes synthétiques.

On a ainsi tiré parti de l'oxydation des acides biliaires par différents réactifs, employés eux-mêmes dans des conditions variées. La distillation sèche, utilisée déjà pour l'étude du cholestérol, a été également appliquée par Wieland et Kulenkampf [307] à celle des acides biliaires ; elle a permis de préciser, dans la formule des diacides, la position respective des carboxyles. En réduisant les cétones par le zinc amalgamé et l'acide chlorhydrique, selon les indications de Clemmensen [63], on a pu passer d'une série d'acides à une autre.

Nous conservons ici, dans ses grandes lignes, l'ordre adopté par W. Borsche.

1° *Oxydation chromique. Obtention d'acides cétoniques et d'acide cholanique.* — Ce mode d'oxydation enlève 3H^2 à l'acide cholalique I et donne l'acide déhydrocholique II, de Hammarsten [127] ; il renferme trois groupements cétoniques provenant des trois fonctions alcool de l'acide cholalique, et décelés par la formation d'une trioxime. Traité de la même manière, l'acide désoxycholique III conduit à l'acide déhydrodésoxycholique IV $\text{C}^{21}\text{H}^{36}\text{O}^1$ (ancien acide déhydrocholénique de Latschinoff [169], (1) dont les deux groupements cétoniques donnent une dioxime (la transposition de cette dernière a été étudiée par Schenck [261])). La méthode de Clemmensen réduit l'acide déhydrocholique en donnant, selon les conditions réalisées, soit l'acide cholanique V, soit le β cholanedionoïque VI de Borsche [32] et de Wieland et Boersch [306]. L'acide déhydrodésoxycholique fournit de son côté, avec l'acide cholalique, un acide $\text{C}^{21}\text{H}^{35}$ (CO)-(CHOH)-COOH et l' α cholanoïque VII.

(1) Contrairement à cette assertion de Pregl [234] que l'acide cholénique et l'acide désoxycholique, ainsi traités, fournissent deux dérivés différents, Wieland et Sorge [304] ont montré qu'il se forme un seul et même acide déhydrodésoxycholique, ce qui confirme la relation signalée plus haut entre ces deux acides.



A l'acide chénodésoxycholique correspond également un acide cétonique isomère du composé IV, et dont la réduction donne l'acide cholanique V (Windaus, Böhne et Schwarzkopf [329]). L'oxydation de l'acide lithocholique conduit de même à l'acide déhydrolithocholique (Wieland et Weyland [309]).

En étudiant l'acide anthropodésoxycholique, Wieland et Reverey [317] ont constaté que, dans certaines conditions, on peut réduire l'acide cétonique et régénérer l'acide primitif (1).

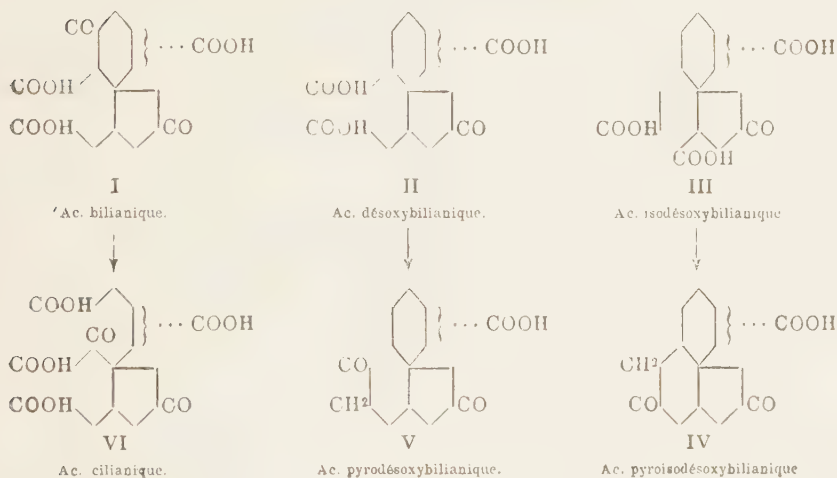
(1) Par contre, la réduction de l'acide cétonique provenant de l'acide hyodésoxycholique a donné à Windaus et Böhne [328] un acide cholanique isomère de l'acide ordinaire et nommé par ces auteurs acide « hyocholanique ». De nouvelles recherches ont montré à Windaus [334] l'existence de deux acides cétoniques isomères dont l'un (α) conduit à l'acide cholanique normal, mais se transforme aisément en un autre acide (β) qui seul est réduit en acide hyocholanique ou allocholanique. L'acide hyodésoxycholique appartient à la série cholanique, dérivée du pseudocholestane I.

Afin de préciser la formule de ces acides cétoniques, Borsche et Frank [35] ont utilisé leur combinaison avec les aldéhydes aromatiques et avec l'isatine, en comparant les résultats obtenus avec ceux que fournissent les acides cétoniques décrits plus loin. Les mêmes auteurs ont essayé sans succès de régénérer les acides cholalique et désoxycholique par hydrogénation catalytique des acides cétoniques correspondants [37]; ils n'ont obtenu, tout d'abord, avec l'acide déhydrocholique, qu'un acide choalique différant, par son pouvoir rotatoire, du produit naturel. Borsche et Feske [40] ont constaté par la suite que ces deux acides étaient identiques et que l'acide déhydrodésoxycholique conduisait de son côté à l'acide désoxycholique (d'autres dérivés se prêtent à de semblables hydrogénations). Ces auteurs ont d'autre part [41] repris l'étude de la condensation de l'acide déhydrocholique avec la benzaldéhyde et obtenu en outre un composé résultant de l'accouplement direct de deux molécules d'acide.

2° *Oxydation permanganique.* — *Acides bilianiques et dérivés.* — A la température ordinaire, le permanganate en solution alcaline oxyde l'acide cholalique en acide bilianique I (Cleve [64]), qu'accompagne un peu d'acide isobilianique (Latschinoff [171]); l'acide désoxycholique donne, de son côté, l'acide désoxybilianique II, également associé à un acide isodésoxybilianique. Il se crée cette fois de nouvelles fonctions acides, dont l'obtention est encore plus aisée à partir des acides partiellement réduits du paragraphe précédent; l'oxydation se fait évidemment ainsi:



Ces composés possèdent les formules suivantes (1):



La nature de l'isomérisie n'est pas encore parfaitement déterminée. D'après Wieland et Adickes [313], on peut la traduire en donnant à l'acide isodésoxybilianique la formule III.

La distillation de cet acide dans le vide fournit l'acide pyroisodésoxybilianique IV de Wieland et Kulenkampf [307], en même temps qu'une cétone saturée $\text{C}^{22}\text{H}^{32}\text{O}$ (Borsche [36]); l'autre isomère conduit à l'acide pyrodésoxybilianique V.

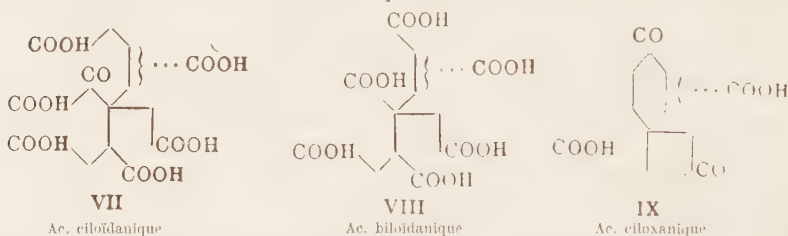
On connaît aussi l'acide chénodésoxybilianique (Windaus, Böhne et Schwarzkopf [329]), et l'acide lithobilianique (Wieland et Weyland [309]).

(1) Les oximes et leur transposition ont été étudiées par Schenck, et par Schenck et Kirchhoff [267].

Borsche et Rosenkranz [31] ont pu réduire, d'une part l'acide bilianique en acide désoxybilianique et, d'autre part, l'acide isobilianique en acide isodésoxybilianique, ces réactions constituent un passage de la série cholalique à la série désoxycholique.

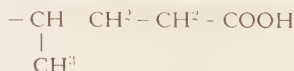
En poussant plus loin l'oxydation permanganique de l'acide désoxycholique, on n'a encore rien constaté d'intéressant; par contre, l'acide bilianique donne l'acide cilianique VI de Schenck [259] (1).

3° Oxydation nitrique. Acides biloïdanique et choloïdanique, etc. — a) Appliqué à l'acide cholalique, ce moyen d'oxydation est moins favorable que les précédents à l'obtention de composés définis. On peut citer l'acide biloïdanique VIII qui dérive de l'acide bilianique (2) et dont la formule primitivement donnée par Schenck [260] a été corrigée par Wieland et Schlichting [312]; ces auteurs ont également montré qu'il était identique à l'acide norsolannellique signalé plus loin et qui se rattache à l'acide désoxycholique. L'oxydation nitrique de l'acide cilianique VI conduit également à l'acide biloïdanique (3), par l'intermédiaire de l'acide ciloïdanique VII.



Dans certaines conditions, l'oxydation de l'acide cilianique fournit un acide ciloxanique, auquel Borsche et Frank [39] attribuent la formule IX.

Un traitement prolongé de l'acide cholalique par l'acide nitrique bouillant provoque une dislocation plus profonde (Panzer) [217]; on n'a pu toutefois caractériser nettement que l'acide succinique et l'acide α-méthylglutarique qui proviennent sans doute de la chaîne latérale. De ces constatations, Wieland, Schlichting et Jacobi [320] ont déduit que cette chaîne était:

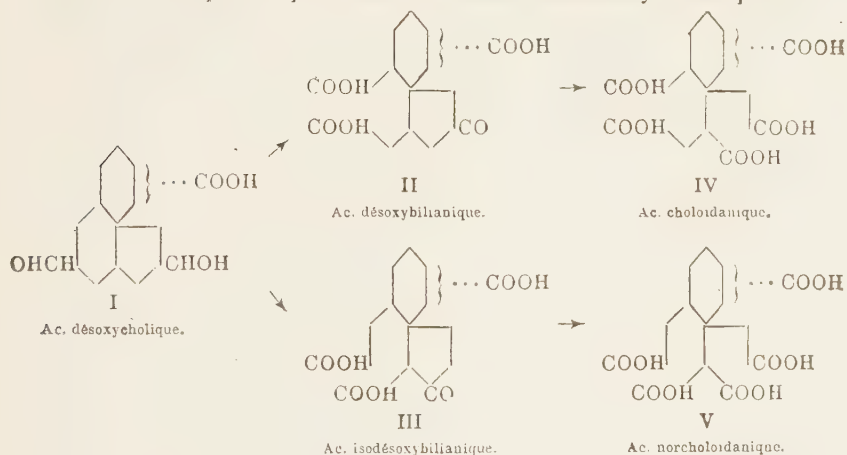


(1) Borsche et Frank ont attribué récemment [38] à cet acide une autre formule sans groupement cétonique en C¹ et avec un oxhydre en C¹², en même temps qu'ils modifiaient les formules des autres acides mentionnés plus loin. Ces conceptions n'ont pas été admises par Wieland [321].

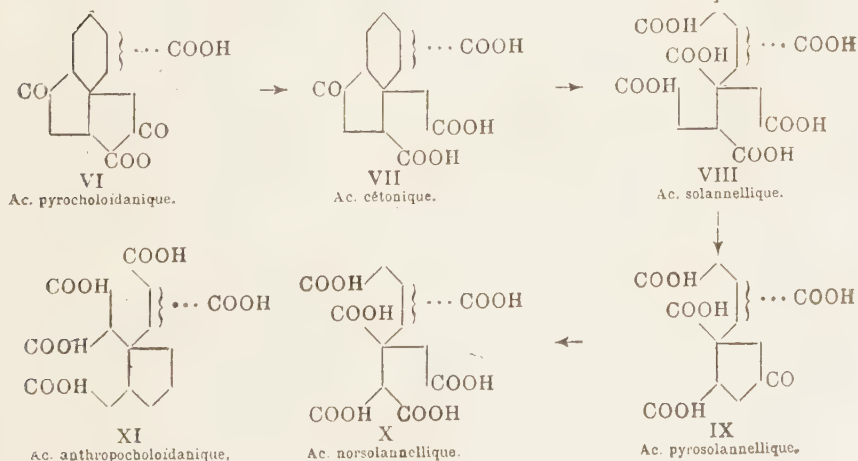
(2) L'acide isobilianique donne un acide bilisoïdanique étudié par Schenck [264].

(3) Schenck [262] a repris l'étude de la formule et de la préparation de cet acide.

b) Avec l'acide désoxycholique I, les résultats ont été plus faciles à interpréter, ce qui peut tenir à la présence, dans cet acide, de deux oxhydryles seulement. A côté des acides désoxybilanque II et isodésoxybilanque III déjà mentionnés, il se forme l'acide choloïdanique IV de Wieland [308], découvert il y a longtemps par Theyer et Schlosser [283], et appelé par Latschinoff [170] acide cholécamphorique en raison de son isomérisie pré-tendue avec l'acide camphorique (1). Contrairement à ce que l'on pensait jusqu'à maintenant, cet acide choloïdanique ne dérive pas de l'acide cholalique, mais uniquement de l'acide désoxycholique I, ainsi que l'indiquent ces formules; le composé V est l'acide norcholoïdanique auquel conduit l'acide isodésoxybilanque III.



La distillation dans le vide de l'acide choloïdanique IV a



(1) On connaît aussi un acide pseudocholoïdanique (Wieland [314]) dont la formation par oxydation nitrique de l'acide désoxybilanque a été invoquée par Wieland, Schlich-jing et Jacobi [320], pour établir la structure du noyau IV de l'acide cholanique.

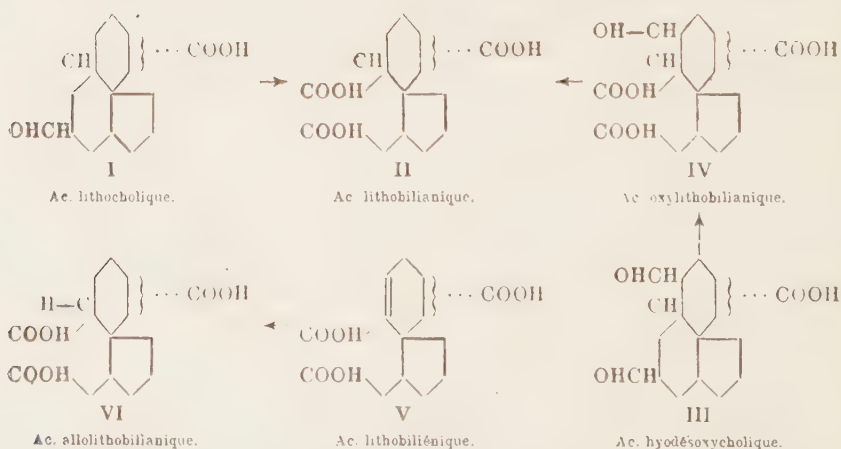
donné ensuite à Wieland et Schulenburg [310] l'acide pyrocholoïdanique VI, décomposable par les alcalis en un mélange d'acides cétoniques isomères, dont l'un VII fournit par oxydation l'acide solannellique VIII. La même succession d'opérations transforme ce dernier en acide pyrosolannellique IX, puis en acide norsolannellique X, dont Wieland et Schlichting ont montré l'identité avec l'acide biloïdanique mentionné plus haut (I).

En oxydant progressivement l'acide pyrodésoxybilianique, Wieland et Mothes [316] ont obtenu ce même acide; on peut aller ainsi jusqu'à un triacide très dégradé $(\text{COOH}\cdot\text{CH}^2)^2 - \text{C}^6\text{H}^{15}\text{COOH}$. (Wieland et Schlichting) [316 bis].

D'autre part, la formation d'un acide anthropocholoïdanique XI contribue, selon Wieland et Jacobi [318], à préciser la position des oxyhydyles de l'acide anthroppo-désoxycholique.

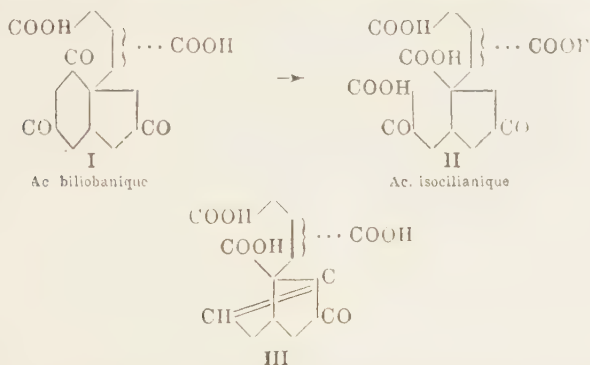
A l'acide choloïdanique se rattache enfin le carbure d'hydrogène $\text{C}^{11}\text{H}^{16}$ qu'a fourni à Panzer [216] la distillation de cet acide sur la chaux sodée.

c) L'acide *lithocholique* I, oxydé par NO^2H , donne l'acide lithobilianique II, dont la production à partir de l'acide hyodésoxycholique a conduit Windaus [334] à considérer ce dernier comme un dérivé de l'acide cholanique normal; on a vu plus haut que ce point était sujet à discussion. Sous l'action de l'hypobromite, l'acide hyodésoxycholique III a donné l'acide oxylithobilianique IV, lequel fut ensuite réduit en acide lithobilianique II. L'isomère stérique de ce dernier, l'acide allo-lithobilianique VI a été en outre obtenu en passant par l'acide lithobiliénique V.



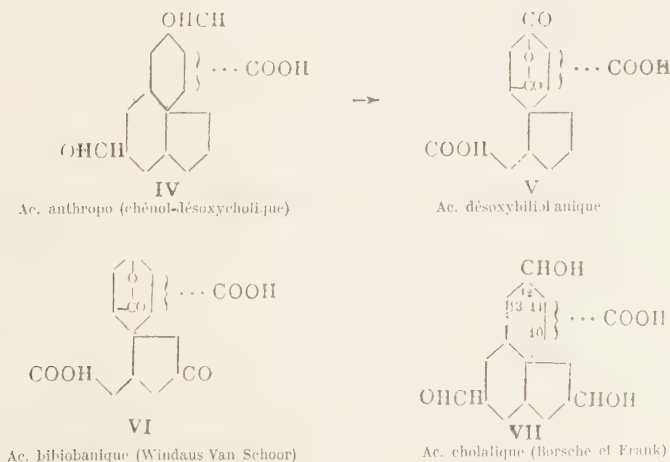
(I) Sur l'interprétation de ces réactions pour l'établissement des formules, voir Grigaut [120].

4° *Oxydation par le brome; acide biliobanique.* — En milieu acétique, l'acide cholalique est simplement oxydé par Br en acide déhydrocholalique, qui fixe ensuite l'halogène (Lassar-Cohn [166], Jansen [154]). Pringsheim fit agir le brome sur l'acide cholalique en solution fortement alcaline, et obtint ainsi l'acide biliobanique [236], auquel Wieland et Fukelmann ont attribué la formule I; en cherchant à le transformer en acide cilia-nique, ces auteurs ont préparé l'acide isocilia-nique II qui donne lui-même, par chauffage avec SO^1H^2 , l'acide cétonique non saturé III.



L'acide chénodésoxycholique (ou anthropodésoxycholique) IV fournit de son côté l'acide désoxybiliobanique qui, selon Windaus et Van Schoor [331-332], possède la formule V; l'un des oxhydryles de l'acide biliaire en question se trouve placé par conséquent en C^{12} et, de plus, la formule I donnée à l'acide biliobanique devient inexacte et doit être remplacée par la formule VI.

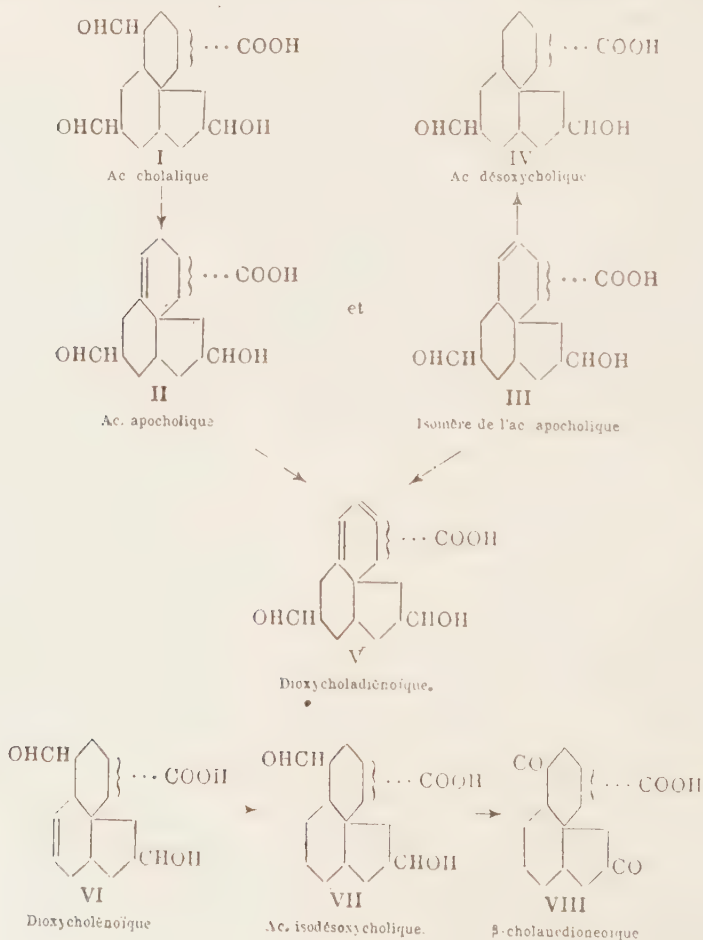
Il en résulte, d'après Borsche et Frank, que l'un des oxhydryles de l'acide cholalique est également situé en C^{12} et non en C^{13} (formule VII).



5° *Obtention d'acides non saturés.* — Pour éviter que l'action des réactifs oxydants ne s'exerce ainsi en divers points de la molécule et ne reste difficile à régler, on a cherché à éliminer les oxhydryles avant d'effectuer l'oxydation. En distillant l'acide cholalique sous pression réduite, Wieland et Weil [303], ont provoqué le départ de $3\text{H}_2\text{O}$ et préparé un acide non saturé $\text{C}^{21}\text{H}^{34}\text{O}^2$ (cholatriénoïque).

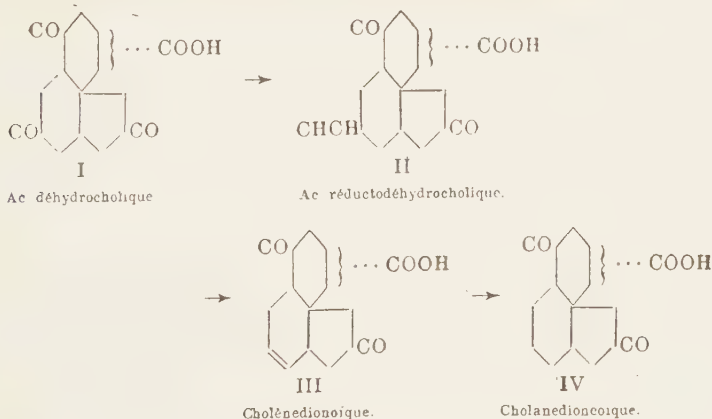
L'acide désoxycholique donne l'acide $\text{C}^{21}\text{H}^{34}\text{O}^2$ (choladiénoïque). Ces deux acides sont réduits par l'hydrogène en un même acide cholalique (Wieland) [308]; à ce même acide conduit l'acide lithocholique, par l'intermédiaire du cholénoïque (Wieland et Weyland) [309].

Cette déshydratation de l'acide cholalique I peut être partielle (Boedecker) [25]; il se forme alors l'acide apocholique II, qui donne, comme l'acide désoxycholique, des complexes du type

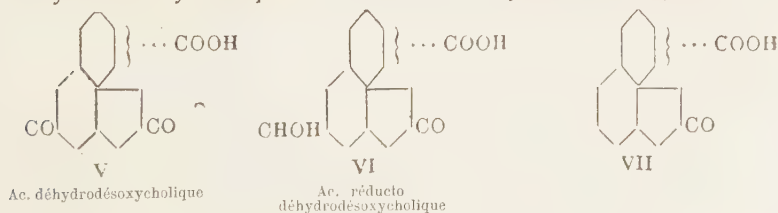


cholénique. On n'a pu le réduire en acide désoxycholique IV mais Boedecker et Volk [26] ont montré qu'il était accompagné d'un isomère III qui se prête à cette réaction, quoiqu'il ne fournisse pas de complexes choléniques. L'acide apocholique et son isomère peuvent fixer 2 Br, et perdre ensuite 2 HBr en conduisant à un même acide non saturé V. Un troisième acide non saturé VI a été obtenu par Wieland, Honold et Pascual Vila [315]; l'acide saturé correspondant est l'acide isodésoxycholique VII dont l'oxydation chromique donne l'acide dicétocholanique VIII que nous avons déjà rencontré.

6° *Obtention de l'acide réductodéhydrocholique, etc.* — La production de cet acide se rattache à la réduction des acides cétoniques résultant de l'oxydation chromique des acides biliaires (page 17) et dont il s'agissait de régénérer les fonctions alcooliques. A l'aide de l'amalgame d'aluminium, Borsche et Hallwass [34] n'ont réduit que l'un des groupements cétoniques de l'acide déhydrocholique I, ce qui donne l'acide réductodéhydrocholique II, déjà isolé par Schenck [258] après réduction électrolytique. C'est le carbonyle du noyau I qui a été réduit, car la déshydratation de l'acide II donne l'acide non saturé III qu'il suffit d'hydrogéner pour avoir l'acide dicétocholanique IV.



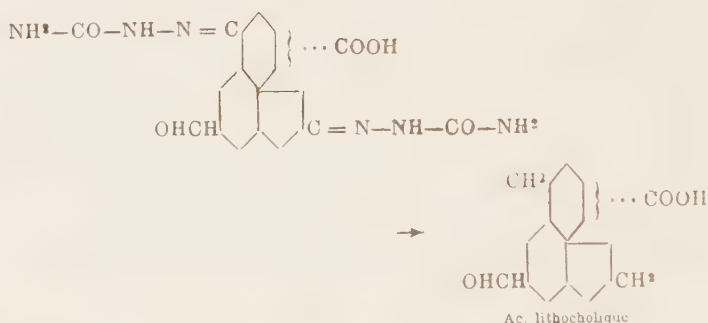
Schenck et Kirchoff [266] ont également transformé l'acide déhydrodésoxycholique V en un acide oxycétocholanique VI ana-



logue à II, et dont la distillation dans le vide conduit à l'acide monocétonique VII déjà décrit par Wieland et Boersch (p. 17).

Comme il est dit p. 18, Borsche et Feske [40] ont pu pousser la réduction plus loin et reproduire les acides cholalique et désoxycholique, tandis que Wieland et Reverey [317] ont obtenu la même réaction avec l'acide anthropodésoxycholique.

7. *Passage des séries cholalique et désoxycholique à la série lithocholique.* — Borsche et Hallwass ont réalisé ce passage en décomposant par l'éthylate de sodium la disemicarbazone de cet acide réductodéhydrocholalique II, ce qui donne l'acide lithocholique.



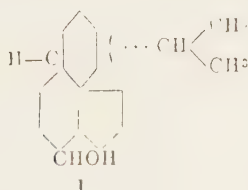
Les disemicarbazones des acides bilianique et désoxybilianique conduisent de même à l'acide lithobilianique; à partir de l'acide iscbilianique, on obtient également pour la première fois l'acide isolithobilianique. L'emploi des semicarbazones permet en outre de faire disparaître les trois groupements CO de l'acide déhydrocholique et de préparer ainsi l'acide cholanique.

C'est évidemment un tel passage d'une série à l'autre qu'ont observé Windaus, Bohne et Schwartzkopff lorsqu'ils ont réduit l'acide chénodésoxybilianique en acide lithobilianique [329].

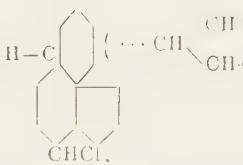
IV. RELATIONS CONSTATÉES ENTRE LE CHOLESTÉROL ET LES ACIDES BILIAIRES

a) Ces relations sont apparues à plusieurs reprises au cours de ce chapitre; on a pu constater en particulier la position intermédiaire occupée par l'acide cholanique, que fournit à la fois l'oxydation du pseudocholestane et la réduction des acides biliaires. L'acide allocholanique établirait d'autre part une liaison identique entre le cholestane et l'acide hyodésoxycholique, si ce dernier

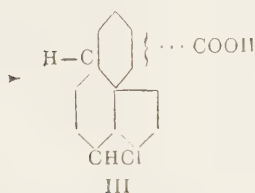
n'avait été rangé par la suite dans la même série que ses isomères, mais il se peut que soient découverts de nouveaux acides qui se rattachent effectivement à l'allocholestérol. Dans les deux cas, c'est donc sur les carbures qu'ont porté les oxydations et non sur les stérols correspondants; il faut éviter en effet qu'elles ne s'effectuent au niveau de la fonction alcool et de la double liaison, qui sont les points fragiles de la molécule. C'est d'ailleurs la chaîne latérale qu'il s'agit de modifier, en éliminant sous forme d'acétone un groupement isopropylique, et en introduisant un carboxyle. De même, Windaus et Hossfeld [330], pour passer du cholestérol à l'acide oxyhyocholanique (qui se nommerait maintenant : oxy-allocholanique IV), ont dû partir, non de l'oxycholestane I, mais du chlorocholestane II, et ne replacer l'oxyhydrile primitif qu'après que l'oxydation de la chaîne latérale eut fourni l'acide chloré III.



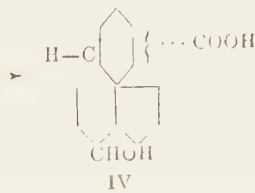
I
Oxycholestane.



II
Chlorocholestane.

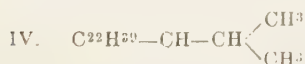
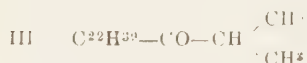
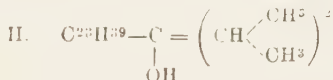
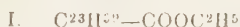


III
Ac. chloro-allocholanique



IV
Ac. oxyallocholanique

b) Il était intéressant de parcourir le même chemin en sens inverse, et de revenir de l'acide cholanique au pseudocholestane. Wieland et Jacobi [319] ont tiré parti des réactions suivantes: avec l'iodure d'isopropylmagnésium, le cholalate d'éthyle I donne, selon le mécanisme habituel, l'alcool tertiaire II (diiso-

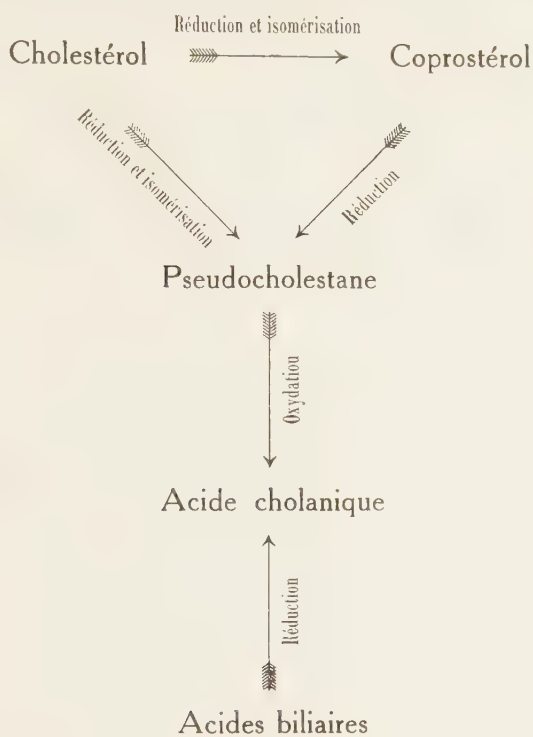


propyl-norcholylcarbinol); le principal produit de l'oxydation chromique de cet alcool est la pseudocholestanone III, dont la réduction conduit au pseudocholestane IV.

V. CONCLUSION

Malgré ses lacunes et les sèches énumérations auxquelles nous avons dû souvent nous borner, cet exposé correspond sensiblement à l'état actuel de nos connaissances sur la chimie des acides biliaires. Après nous être ainsi efforcé de dresser le bilan des principales acquisitions faites, en particulier dans ces dernières années, il nous semble que cette brève conclusion puisse être légitimement tirée.

Malgré la difficulté que présentent de telles recherches, et que la lecture des travaux originaux permettrait d'apprécier mieux encore, les grandes lignes du squelette carboné commun au cholestérol et aux acides biliaires se laissent maintenant percevoir. Des quatre noyaux que comporte leur molécule, deux au moins ne prêtent guère à discussion, tandis que la position des groupements fonctionnels et la nature de la chaîne latérale sont établies d'une manière très vraisemblable. Toutes provisoires qu'elles puissent être, les formules admises aujourd'hui traduisent en effet, de façon satisfaisante, le mode de formation des nombreux dérivés déjà connus. Elles seraient sans doute parfaitement précisées si la synthèse de semblables noyaux hydrogénés était elle-même réalisable; lorsque sera atteint ce stade, la chimie du cholestérol et des acides biliaires constituera un chapitre homogène de la chimie organique, et offrira de ce fait un remarquable caractère de certitude. D'autre part, le plus intéressant des composés décrits est sans conteste l'acide cholanique, dont le double mode d'obtention, à partir du cholestérol et des acides biliaires, suffirait à démontrer l'existence, entre le premier et les seconds, d'une étroite parenté. Elle peut être traduite par ce schéma, emprunté à Grigaut [120] :



CHAPITRE II

LA COMPOSITION GÉNÉRALE
DE LA BILE

Pour la raison que nous avons donnée plus haut, à savoir la nécessité de connaître dans ses grandes lignes la constitution éventuelle des milieux étudiés, nous avons rassemblé dans quelques tableaux les résultats d'un certain nombre d'analyses de biles, effectuées depuis une cinquantaine d'années par divers auteurs. Sans prétendre à une parfaite exactitude, ces analyses montrent du moins le taux que peuvent atteindre les principaux éléments de la bile, dont plusieurs sont susceptibles d'intervenir lors du dosage des sels biliaires. Indépendamment de cette considération, on pourra avoir, à l'occasion, quelque intérêt à trouver ces chiffres réunis.

Nous avons pour cela tiré parti des indications déjà recueillies par Dastre [75], Roger [241], Oppenheimer [215], et surtout par Rosenbloom [244]. La plupart des références sont empruntées à ce dernier; nous avons vérifié toutes celles qui nous étaient accessibles, ainsi que les résultats figurant dans les mémoires correspondants. Nous y avons joint ceux de quelques autres auteurs, en nous limitant aux analyses plus ou moins « complètes » de biles, et en laissant de côté les très nombreux résultats de dosage des seuls sels biliaires. Ces valeurs, très dissemblables, pourraient être relevées dans les mémoires techniques cités au cours de ce travail, et surtout dans les publications de physiologie ou de médecine qui leur ont fait suite. Nous grouperons dans un tableau spécial (p. 194) les résultats que nous avons obtenus pour notre part.

Il convient d'envisager successivement les biles animales, les biles vésiculaires humaines, les biles de fistule, et enfin le liquide de tubage duodéal.

I. — BILES ANIMALES

	BEUF	BOVDES	CHIEN	CHIEN	CHIEN	VEAU	PORC	PORC	KANGOUROÛ	OLE	PYTHON		
	Berzelius (1)	Pan. Brunet et Rolland (1)	Hoppe-Seyler (2) (vésicule)	Hoppe-Seyler (2) (fistule)	Pictre [225]	Pictre [225]	Pictre [225]	Gundlach et Strecker (1)	Schlössberger (1)	Marson (1)	Vogtenberger et Schlossberger (1)		
Eau.	94.4	909.7	977.28	994.00	760	889	845	888	858.7	800.2	904.2		
Substances dissoutes	95.6	90.5	22.72	5.42	240	111	155	112	141.3	199.8	95.8		
Sels biliaires . . .	—	13.5	11.95	3.46	197	91	120	83.8	75.9	149.6	84.6		
Sels minéraux. . .	12.6	12.5	0.19	0.41	17.3	9.9	16.3	—	—	21.0	2.0		
Mucines et Pigments	3.0	—	14.27	0.49				5.9	43.4	25.6	8.9		
Cholestérine . . .	60.0	1.10	4.49	0.07	11.0	5.0	18	—	10.9	3.6	0.3		
Lécithine.			2.69	0.12				—				—	
Graisses	6.0	—	2.84	0.33				22.3	—	—	—	—	—
Savons	—	—	3.15	0.13				—	—	—	—	—	—
Acides gras. . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			

(1) Cité par Roger [241].

(2) Cité par Dastre [75].

II. — BILE HUMAINE (VÉSICULE)

	Frerichs 103	Frerichs 103	Gorup Besanetz 116	Gorup Besanetz 116	Hoppe- Seyler 149	Trifanowski (289) (malades)	Trifanowski 289	Baginsky et Sommerfeld (12) (enfants)	Birch et Spang (5)	Hammarsten 151	Hammarsten 152 (enfants) min.-max	Jacob- witsch 152 (enfants)	Roger (4)	Czylarz 174		
Eau	85.2	9.9	122.7	122.1	—	68.6	911.0	896.5	979.7	829.68	850.40	855-900	860	905.7		
Substances dissoutes	149.3	149	177.3	101.9	—	91.2	89.2	103.5	20.3	170.22	160.20	98-145	140	94.3		
Sels biliaires	61.4	72.2	107.9	56.5	39.0	39.5 (1)	19.6	25.2	0	96.97 (2)	87.23 (3)	5.5-14	53.7	46.7		
Sels minéraux.	7.8	6.5	10.8	6.3	37.6	—	—	9.1	8.2	5.10	5.38	5.2-7.3	7.99	8.5		
Mucines et Pigments	29.6	29.6	22.1	14.5	12.9	24.3	13.0	20.0	12.1	41.91	44.37	0-36	41.44	18.0		
Cholestérine	2.6	1.6	47.3	30.9	3.5	2.5	3.3	3.4	—	9.86	8.70	1.7-3.0	5.75	6.6		
Lécithine.	9.2	3.2			5.3	5.2 (A)	0.17	—	—	2.23	1.41	2.5-0.8 (A)	2.17	—		
Graisses					7.3	—	3.6	6.7	—	1.90	6.50	—	1.50	5.6		
Savons	—	—	—	—	13.9	8.2	16.3	—	—	11.17	10.58	—	9.39	—		
Acides gras.	—	—	—	—	—	—	—	—	—			—	—	—	—	—

(1) Dont 21 de glycocholate et 7.5 de taurocholate.

(2) Dont 69.57 de glycocholate et 27.40 de taurocholate.

(3) Dont 67.89 de glycocholate et 19.34 de taurocholate. (3)

(4) Cité par Chiray et Pavel [40].

(5) Cité par Rosenbloom [244].

(A) Plus les acides gras.

III. — BILE HUMAINE (FISTULE.)

	Jacobson [153]	Hammarsten [215]	Capeman et Winston [66]	Yeo et Hervon [339]	Robson [240]	Paton et Balleur [219]	Zelronski [341]	Donnan [30]	Mezies [198]	Rosen- bloom [244]	Roger (5)	Von Zeynek [342]	Brault [43]
Eau	97.4	64.74	95.77	97.10	81.9	93.0	88.8	64.6	97.4	97.0.2	97.6	99.7	982.2-983.6
Substances dissoutes	22.6	35.26	14.23	12.84	18.0	11.9	112.2	35.4	22.53	29.8	24	30.7	17.8-31.4
Sels biliaires . . .	10.1	13.24 (2)	6.25	2.2 (4)	7.52	4.0	34.3	18.33	4.16	10.1	5.65	18.3	4.3-13.4
Sels minéraux . . .	8.3	8.32	4.51	8.78	7.58	—	61.3	7.2	5.16	9.2	7.38	9.4	7.8
Mucines et Pigments	2.3	5.29	2.42	1.48	1.25	7.1	11.14	4.97	9.29	4.86	8.11	2.0	2.6-2.8
Cholestérine . . .	0.35	1.60	1.50	—	0.45	0.53	—	1.67	0.94	2.61	0.81	—	0.7-1.0
Lécithine	0.05	0.57	0.99	0.33	—	—	5.16 (A)	0.58	2.98 (B)	6.42	0.45	—	—
Graisses	—	0.22	0.65	—	0.12	0.09	0.75	0.96	—	6.85	0.73	3.10	—
Savons	1.5	—	—	—	0.99	0.15	—	—	—	2.60	0.85	—	1.3-4.4
Acides gras	—	1.23	1.36	—	—	—	—	1.37	—	1.20	—	—	—

- (1) Dont 6.28 de glycocholate et 3.03 de taurocholate.
 (2) Dont 16.16 de glycocholate et 2.08 de taurocholate.
 (3) Dont 6.86 de glycocholate et 2.18 de taurocholate.

- (4) Dont 1.60 de glycocholate et 0.55 de taurocholate.
 (5) Cité par Chiray et Pavel [60].

(A) Plus les acides gras.

(B) Plus les acides gras des savons.

IV. — LIQUIDE DUODÉNAL

Il ne semble pas que le liquide duodénal ait fait l'objet de semblables analyses générales. On s'est surtout attaché à y doser les éléments caractéristiques de la bile : pigments, sels biliaires et cholestérol. Les chiffres indiqués sont très variables, surtout à l'état pathologique, et, d'autre part, on ne saurait oublier que le liquide extrait par tubage duodénal n'est pas d'origine uniquement biliaire, mais que les autres sécrétions digestives s'y mélangent dans une certaine mesure; aussi s'agit-il ici, pour chacun des constituants dosés, de valeurs relatives, qui doivent être rapprochées les unes des autres.

Pour nous borner, parmi une littérature très abondante, aux valeurs *normales* relevées par quelques auteurs français, nous rappellerons que, selon Chabrol, Bénard et Gambiliard [47], le taux moyen normal du liquide duodénal en pigments est de 1/1480 (soit 0 gr. 7 par litre); celui des sels biliaires est d'environ 9 gr. et la teneur en cholestérol est comprise entre 0,10 à 1,20. Chiray et ses élèves [51, 52, 53] ont trouvé, dans les trois biles de tubage, les doses suivantes :

	<i>Pigments</i>	<i>Cholestérol</i>
Bile A.....	0 0,5 à 0,100	0,50
Bile B.....	0,200	1,50
Bile C.....	0 0,40	Traces à 0,50

A ces chiffres, Chiray et Marcotte [61] ont joint récemment ceux que leur a fournis notre méthode colorimétrique (p. 155): Ils estiment que, normalement, le taux des sels biliaires, exprimé en acide cholalique, est de 3 à 4 gr. dans la bile A, de 8 à 11 gr dans la bile B, et de 1,5 à 2,5 gr. dans la bile C.

CHAPITRE III

ISOLEMENT DE QUELQUES ACIDES
ET SELS BILIAIRES

Il est impossible de faire aucune recherche valable sur le dosage des sels biliaires si l'on ne dispose, pour les essais nécessaires, que des produits commerciaux. Nous étant d'abord procuré de tels échantillons, nous n'avons pas tardé à les rejeter. Comme certains auteurs ont cru pouvoir s'en contenter, nous reproduirons ici quelques constatations probantes, que nous rapprocherons des observations d'autres chimistes sur le même point.

I. — EXAMEN DE SELS BILIAIRES DU COMMERCE

Nous avons eu entre les mains, au début de nos recherches, une poudre amorphe, jaune, étiquetée « *sels biliaires* », qui dégageait une odeur rappelant celle des extraits d'organes, et fournissait une solution aqueuse ou alcoolique très colorée. Quoiqu'il s'agisse manifestement d'un produit très impur, pour l'obtention duquel la bile n'avait subi qu'un traitement assez sommaire, nous nous sommes demandé par la suite dans quelle mesure les sels biliaires entraient dans sa composition. La solubilité complète de cette poudre dans l'alcool montrait que les protéines avaient été éliminées. Nous n'avons pu déceler d'urée, par la réaction au xanthidrol. Sa teneur en azote total (Kjeldahl) était de 2,89 %, chiffre voisin de celui qui correspondrait à un mélange de glycocholates et de taurocholates, mais la méthode gazométrique, décrite plus loin, permettait de doser, avant hydrolyse alcaline, 0,47 % d'azote et, après hydrolyse, 2,25 % ; l'azote aminé attribuable aux sels biliaires n'atteignait donc que 1,78 %. D'autre part, nous avons dosé, par pesée et après fusion alcaline, 1,26 % de soufre. Si l'on suppose que ce soufre ne provient que des sels biliaires sulfurés, le mode de calcul indiqué p. 173 conduit à admettre que le produit renferme 21,17 % de taurocholate de soude et 38 % de glycocholate, soit seulement 59,17 % de sels biliaires. Après minéralisation, les réactions des phosphates étaient nettement positives, ce qui tenait sans doute à la présence de phospholipides.

Un échantillon de « *taurocholate de soude* », amorphe, passablement coloré, et soluble dans l'eau et dans l'alcool, contenait 2,69 % d'azote total, valeur voisine du chiffre théorique 2,60, mais 2,80 % de soufre au lieu de 5,95. A l'aide de la méthode gazométrique, nous n'y avons trouvé que 1,50 % d'azote aminé des sels biliaires, tandis que, dans un dosage colorimétrique, la teinte produite correspondait à 45,2 % d'acide cholalique. Si, pour faciliter leur comparaison, on exprime arbitrairement ces trois résultats (soufre, azote aminé, acide cholalique) en taurocholate de soude, on aboutit à des pourcentages de 47, 57,7 et 59,5. Le produit renferme donc au moins 30 % de substances étrangères, et de plus semble être en partie formé de sels biliaires non sulfurés.

Un *autre échantillon*, de même origine, présentait un aspect cristallin, dû à des paillettes de contour variable obtenues sans doute par évaporation d'une solution alcoolique. Azote total : 3.10 %; après décoloration partielle par le noir animal en milieu alcoolique : 2.80 %. Mais les autres essais ont donné : azote aminé, 1.85 %; soufre, 2.50 %; acide cholalique, 40 %. Traduits comme précédemment en taurocholate de soude, ces trois résultats conduisent à des pourcentages de 71.1, 52.6 et 42, avec des écarts encore plus marqués que pour le premier échantillon.

Un troisième produit, étiqueté également « *Taurocholate* », renfermait 2.48 % d'azote total, 1.64 % d'azote aminé et 60 % d'acide cholalique (pourcentages calculés: 63 et 78,9). Il était donc aussi très impur et constitué partiellement par des glycholates, avec peut-être de l'acide cholalique non copulé.

Inversement, un « *glycocholate de soude* », de la même marque, était souillé de taurocholate, car il renfermait du soufre, qui n'a pas été dosé. Azote total, 2.12 %; azote aminé, 1.76 %; acide cholalique, 50.8 % (pourcentages, en glycocholate : 61.3 et 60.6).

On ne saurait donc mettre en œuvre de tels produits pour l'étude d'une méthode de dosage. Nous eussions pu, à vrai dire, nous dispenser d'apprécier, du moins approximativement, le degré de pureté de ces échantillons qui ne possédaient pas les caractères de composés définis. Il n'était pas toutefois sans intérêt d'ajouter ces quelques observations à celles, déjà anciennes, de Lewis [181]. Cet auteur a étudié les variations de composition du glycocholate de soude, lorsque ce sel était obtenu suivant des techniques différentes. Il a constaté que les sels « mixtes » fournis par les

méthodes ordinaires n'étaient pas toujours constitués par un mélange de glycocholate et de taurocholate. Ils semblent être accompagnés de sels sodiques d'acides gras non azotés, qui peuvent être plus abondants que les sels biliaires eux-mêmes (plus de 50 % du produit). Lassar-Cohn [167] ayant trouvé dans la bile du myristate de soude, Lewis suppose que ce sel peut atteindre un taux appréciable (1). D'autre part, Long et Gephart [185] ont observé que les sels biliaires entraînent un complexe phosphoré, considéré par divers auteurs comme une lécithine, et qu'on ne réussit pas à éliminer. Dans un tel précipité cristallin, ils ont trouvé 0.29 % de phosphore (ce qui correspondrait à 7.5 % de lécithine). Une affinité particulière des sels biliaires pour la lécithine est montrée par ce fait que ces sels peuvent maintenir en solution environ 80 % de leur poids de lécithine. Dans des dosages ultérieurs, Long et Johnson [186] ont décelé de 1.1 à 1.32 % de P^2O^5 dans six échantillons de sels biliaires du commerce, et des traces dans d'autres.

II. — ISOLEMENT D'ACIDES ET DE SELS BILIAIRES

Nous avons eu besoin, pour notre travail, des produits suivants : acide glycocholique, taurocholate de soude, hyoglycocholate de soude, acide cholalique, acide désoxycholique et acide anthropo-désoxycholique; nous laisserons donc de côté les autres composés mentionnés. Une description, même sommaire, des nombreuses méthodes d'extraction déjà publiées et des caractères des produits obtenus ne saurait être faite ici; on trouvera sur les unes et les autres des renseignements plus ou moins détaillés dans les ouvrages de documentation, tels que le répertoire de Beilstein, le dictionnaire de Wurtz, le lexique d'Abderhalden [2] et dans la monographie de Hammarsten [133], qui nous a été très utile. Nous nous bornerons aux procédés que nous avons employés pour notre part.

1° ACIDE GLYCOCHOLIQUE

A) *Emploi de la méthode de Hüfner* [148]

Cette technique, la plus classique, consiste à déplacer l'acide glycocholique par l'acide chlorhydrique, dans de telles conditions qu'il se forme de fines aiguilles pouvant être recueillies et purifiées. Au lieu d'éliminer en partie les mucines par l'addition d'une

(1) La bile renferme aussi d'autres acides gras (oléique, palmitique) Salkowski [254], etc.

petite quantité d'acide minéral, nous avons déféqué la bile de bœuf par l'alcool, ainsi que le conseille Hammarsten.

500 cm³ de bile fraîche ont été additionnés de 1500 cm³ d'alcool à 95°, puis le mélange fut porté à l'ébullition, pendant quelques minutes, et abandonné pendant une nuit. Après filtration et distillation de l'alcool, le résidu fut repris par 500 cm³ d'eau et la solution recouverte d'une couche d'éther de 3 cm. d'épaisseur. Le mélange fut agité énergiquement et acidifié fortement par 20 cm³ d'acide chlorhydrique concentré, ce qui fit apparaître un précipité vert visqueux se rassemblant au fond du récipient. Au bout d'une heure, le contenu de ce dernier s'était transformé en un magma de fines aiguilles enchevêtrées, qui furent recueillies deux jours plus tard, essorées et lavées à l'eau froide. Le produit fut dissous le plus complètement possible dans 500 cm³ d'eau bouillante, et la solution filtrée laissa déposer par refroidissement de nombreuses aiguilles incolores que l'on fit recristalliser de la même manière. Puis ces aiguilles furent redissoutes dans l'alcool et la solution additionnée d'eau jusqu'à production d'un trouble persistant. Après quelques jours, l'acide glycocholique cristallisé fut recueilli et séché dans le vide phosphorique. Il pesait 3 grammes.

Ce faible rendement s'explique en partie par la production, dans chaque traitement par l'eau bouillante, d'un résidu insoluble; une fraction de l'acide se transforme, comme l'a montré Streccker [279], en un isomère: l'acide paraglycocholique, très peu soluble, même à chaud.

Le point de fusion du produit obtenu était de 127° C. (1) et sa teneur en azote de 3,10 % (théorie 3,01). Il était exempt de soufre et renfermait 0,035 % de phosphore (2). Le pouvoir rotatoire, en solution alcoolique, était $[\alpha]D = +32^{\circ},5$ (3).

En traitant de la même manière d'autres biles de bœuf, nous n'avons observé aucune cristallisation, même après plusieurs

(1) On trouve dans la littérature des chiffres non concordants pour le point de fusion de l'acide glycocholique : 132° C. à 135° C. selon Emich [87], 138° à 140° selon Medwedew [195], 195° selon Bondi et Muller [29]; d'après Letsche [175], l'acide cristallisé dans l'eau commence à se liquéfier (« sintert ») vers 126° et l'acide anhydre à 130-132°. Ces écarts seraient dus à la présence fréquente d'acide paraglycocholique dans l'acide hydraté. Selon Hammarsten, l'acide cristallisé dans l'alcool aqueux possède un point de fusion constant (début 125-127°, fusion avec gonflement à 126-128°).

(2) Dosé à titre d'indication sur la présence de lécithine, par la méthode colorimétrique de Fleury et Zutu [93].

(3) C'est là le pouvoir rotatoire indiqué par Letsche [174], légèrement supérieur à celui que donne Hoppe-Seyler [144], qui est de + 29°.

semaines, et quoique nous évitions, moyennant des essais préalables, d'employer un excès d'acide chlorhydrique et d'opérer à une température supérieure à 2° ou 4° (Letsche) [174]. La substitution de benzine à l'éther (Emich) [87] n'a pas amélioré les résultats. Par contre, il suffisait d'acidifier certaines biles pour faire apparaître très rapidement une grande quantité d'aiguilles, qui étaient recueillies et purifiées (points de fusion 126° à 128°; azote 3,00 à 3,12 %).

Ces rendements très irréguliers ont été maintes fois notés. Hüfner [149], Marshall [190], Emich [87] les attribuent à la présence d'un excès relatif de taurocholate, tandis que Letsche [174] incrimine plutôt l'âge, la race, etc., des animaux.

B) *Emploi de la méthode de Hammarsten [133]*

Cet auteur recommande, lorsque le procédé précédent ne convient pas, d'isoler tout d'abord une fraction riche en acide glycocholique. Nous avons opéré sur 250 cm³ d'un filtrat alcoolique correspondant à 50 cm³ de bile. Après évaporation, le résidu fut repris par 50 cm³ d'eau et additionné d'acétate neutre de plomb (préférable au chlorure ferrique), jusqu'à ce qu'il ne se produise plus de précipité. Ce dernier fut recueilli et délayé dans 50 cm³ d'eau renfermant un excès de carbonate de soude (réaction alcaline). Le mélange fut chauffé au bain-marie pendant 30 minutes et le filtrat évaporé à sec; après reprise du résidu très coloré par 20 cm³ d'alcool absolu et évaporation de la solution alcoolique, le nouveau résidu fut dissous dans 10 cm³ d'eau et la solution d'éther fut additionnée de 2 % d'acide chlorhydrique. Le mélange, énergiquement agité, fut abandonné pendant deux jours, au bout desquels il s'était pris en une masse de fines aiguilles qui ont été recueillies et purifiées comme précédemment. Point de fusion: 126°; azote: 3,05 %.

Ayant traité de la même manière un plus grand volume de bile, nous avons perdu par accident la presque totalité du produit obtenu. Nous n'avons pu qu'y doser l'azote total et l'azote aminé, les chiffres trouvés (3,00 et 2,98 %) étant pratiquement identiques.

C) *Purification d'un glycocholate du commerce.*

Une solution de 10 gr. de poudre dans 200 cm³ d'eau fut additionnée d'une solution de chlorure ferrique à 5 % jusqu'à fin de précipitation. Le précipité recueilli et lavé fut traité par le

carbonate de soude comme dans l'essai précédent, mais en répétant trois fois les extractions, car une seule se montra insuffisante. La cristallisation finale ne se manifesta qu'après amorçage avec quelques cristaux d'acide glycocholique. Le rendement ne fut que de 2 grammes. Azote : 3,06 %; phosphore : 0,02 %; point de fusion : 126-128°.

Aldrich et Bledsoe [7] ont utilisé un mode de purification identique, emprunté également à Hammarsten [133].

Nous n'avons pas préparé de glycocholate de soude, dont nous obtenions des solutions aqueuses en neutralisant un poids connu d'acide glycocholique. Pour faire cristalliser ce sel en aiguilles, on devra dissoudre le produit amorphe dans l'alcool et le précipiter par de l'éther renfermant un peu d'eau (Stöedeler [278]).

2° TAUROCHOLATE DE SOUDE

A) *Méthode sommaire*

Nous ne décrivons cette méthode, employée tout d'abord, que parce que le produit ainsi préparé semble moins impur que l'on ne pourrait s'y attendre.

Elle a consisté à décolorer partiellement 70 cm³ de bile de chien par le noir animal en présence de 500 cm³ d'alcool. Le résidu d'évaporation du filtrat fut repris par 100 cm³ d'alcool absolu et la solution additionnée de 4 volumes d'éther. Après trois traitements semblables du précipité, ce dernier était incolore et renfermait 2,61 % d'azote total, 2,40 % d'azote aminé et 5,22 % de soufre (théorie 2,60 et 5,95).

B) *Méthode de Hammarsten [133]*

Le même volume de bile de chien (70 cm³) fut déféqué par l'alcool et le filtrat évaporé à sec. Le résidu fut dissous dans 50 cm³ d'eau et la solution additionnée de chlorure ferrique à 5 % jusqu'à fin de précipitation. Le filtrat acide étant presque entièrement neutralisé par la soude, on sépara le nouveau précipité formé. Après addition de la même quantité de sel ferrique que précédemment, une seconde neutralisation incomplète fut pratiquée, et le précipité séparé. Le filtrat, dilué de son volume d'eau, fut légèrement alcalinisé; après élimination de l'hydrate ferrique, la saturation du liquide par le chlorure de sodium fit apparaître un précipité floconneux qui fut redissous dans l'eau. Une nouvelle saturation par le chlorure de sodium fournit un

précipité incolore qui fut repris par l'alcool. L'évaporation de cette solution alcoolique donna 1 gramme de taurocholate. Azote: 2,50 %; soufre: 5,80 %.

C) Purification d'un taurocholate commercial

La technique employée dérive de celle de Parke [218] pour le traitement de la bile de chien, et comporte une précipitation du taurocholate par le sous-acétate de plomb ammoniacal. 20 gr. de sel impur furent dissous dans 100 cm³ d'alcool et la solution additionnée de 500 cm³ d'éther. Le dépôt visqueux formé fut repris par 200 cm³ d'eau et le taurocholate précipité par l'extrait de Saturne renfermant 10 % d'ammoniaque, en évitant un excès de réactif. Le précipité recueilli et lavé fut traité par 200 cm³ d'alcool absolu bouillant et la solution évaporée en présence de carbonate de soude (réaction alcaline). Le résidu fut épuisé par l'alcool absolu, le taurocholate précipité par l'éther, redissous dans l'alcool et précipité de nouveau par l'éther. Après dessiccation dans le vide phosphorique, il pesait environ 10 gr. (Azote: 2,52 %, soufre: 5,81 %).

Nous avons utilisé ces produits sans chercher à les transformer en acide taurocholique, ce que l'on pourrait faire en suivant les indications de Hammarsten [130].

3° ACIDE HYOGLYCOCHOLIQUE

Les travaux de Grundelach et Strecker, Jolin, Hammarsten, Windaus et Bohne ont été signalés antérieurement (p. 13). Selon ces derniers auteurs, l'acide α -hyoglycocholique serait identique à l'acide glycodésoxycholique.

En raison des difficultés de séparation des acides α et β , de propriétés d'ailleurs mal connues, nous n'avons cherché à préparer que le dérivé α , par la technique de Hammarsten [133]. Les mucines de un litre de bile de porc furent précipitées par trois volumes d'alcool. Après distillation de l'alcool, le résidu fut dissous dans 3 litres d'eau et la solution additionnée de son volume d'une solution saturée de chlorure de sodium. Le précipité fut recueilli au bout de deux jours et dissous à chaud dans un litre d'eau. On ajouta 200 cm³ de solution saturée de chlorure, porta à l'ébullition et abandonna le mélange pendant deux jours. Le précipité formé, transparent et d'aspect microcristallin, se montra constitué, au microscope, d'éléments allongés et piriformes. Le produit fut repris par l'eau bouillante, précipité de nouveau par le

chlorure de sodium et traité par l'alcool. L'évaporation de la solution alcoolique fournit 10 gr. d'hyoglycocholate. (Azote : 3,20 %; théorie : 3,77).

Une partie de ce sel fut alors dissoute dans l'eau (0,4 %) et la solution, saturée d'éther, acidifiée par 1 % d'acide acétique. Le précipité fut traité par l'éther et dissous dans l'alcool; nous n'avons pu le faire cristalliser par addition ménagée d'eau. Cet acide amorphe n'a servi qu'à des essais colorimétriques (p. 125).

Nous avons eu également entre les mains un hyoglycocholate provenant du laboratoire du Pⁱ Grimbet et préparé par Piettre, sans doute par la méthode qu'a décrite cet auteur [224].

4° ACIDE CHOLALIQUE

Parmi les procédés assez nombreux d'extraction de l'acide cholalique, nous avons choisi celui de Hammarsten [133]. Alors que cette technique ne convient pas pour toutes les biles (1), nous avons obtenu de bons résultats dans un essai isolé. Nous n'avons pas eu à répéter ce dernier, car nous avons trouvé ensuite dans le commerce un produit utilisable.

500 cm³ de bile de bœuf furent désalbuminés par quatre volumes d'alcool à 95° et le résidu de distillation de l'alcool dissous dans un litre d'eau. La solution fut additionnée de 250 cm³ de lessive de soude ordinaire et le mélange chauffé à reflux pendant deux jours. Après refroidissement et neutralisation presque complète, la solution fut filtrée et l'acide cholalique brut précipité par un léger excès d'acide chlorhydrique. Le produit fut dissous, à l'aide d'ammoniaque, dans un litre d'eau et la solution additionnée de chlorure de baryum à 20 % jusqu'à fin de précipitation. L'acide cholalique du filtrat fut de nouveau précipité par l'acide chlorhydrique, trituré avec de l'eau jusqu'à ce qu'il perde sa consistance pâteuse, puis avec une petite quantité d'alcool jusqu'à ce qu'il prenne un aspect cristallin. Il fut purifié par trois cristallisations dans l'alcool chaud et séché à l'étuve (poids : 4 grammes). Son point de fusion était de 195° C.

L'acide cholalique Poulenc, que nous nous sommes alors procuré, afin de vérifier que l'emploi de la méthode colorimétrique (p. 155) n'exigeait pas une telle préparation, était amorphe, mais donnait très intensément la réaction de Mylius (p. 123). Il fournissait, par cristallisation dans l'alcool, des tétraèdres et, après

(1) Auquel cas on doit recourir aux méthodes de Pregl [232], Langheld [165], Pregl et Buchtala [235].

séjour à l'étuve, fondait à 194°. Son titre acidimétrique était correct (écart — 1,5 %).

5° ACIDES DÉSOXYCHOLIQUE ET ANTHROPODÉSOXYCHOLIQUE

Nous n'avons pas tenté d'isoler les acides glycocholénique, taurocholénique, etc., qui subissent d'ailleurs la même hydrolyse alcaline que les composés de la série cholalique et ne sont par conséquent justiciables du même procédé de dosage. Nous étant demandé d'autre part (p. 124) s'il convenait, dans les estimations colorimétriques, de tenir compte de leur présence, nous avons fait état du travail, déjà mentionné p. 12, de Wieland et Sorge sur la nature de l'acide cholénique. Il en résulte que l'élément intéressant des acides de cette série est l'acide désoxycholique. Après avoir commencé à extraire cet acide, suivant les indications des auteurs qui s'en sont occupés (voir Hammarsten [133], Pregl [233], Langheld [165] (1)), nous avons abandonné ces traitements assez longs dès que, grâce à l'entremise de M. Hallion, nous avons pu disposer d'acide désoxycholique, obligeamment fourni par le P^r Wieland.

Il en fut de même pour l'acide anthropodésoxycholique de Wieland et Reverey (p. 14).

(1) White [301] a récemment décrit un mode d'obtention des acides désoxycholique et cholalique.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES PONDÉRALES

Le mode idéal de dosage consisterait à isoler quantitativement les sels biliaires et à les peser. La complexité de ce groupe de substances, la difficulté que l'on éprouve à les séparer de tous les composés qui les accompagnent dans la bile, et en particulier des phosphatides (1), rendent aléatoire une estimation rigoureuse. On a toutefois décrit, surtout au début des recherches sur ce sujet, un certain nombre de techniques, qui conduisent à peser finalement, soit le « bloc » des sels biliaires, soit l'acide cholalique. Nous résumerons ici ces méthodes, à titre documentaire, car nous n'y avons pas eu personnellement recours. Le temps qu'elles exigent, ainsi que, pour beaucoup d'entre elles, l'importance des prises d'essai nécessaires, ne permettaient d'ailleurs pas de les utiliser pour l'analyse de nos liquides duodénaux.

1° *Méthode de Huppert* [150]. — Elle dérive de la technique de Neukomm pour l'extraction des sels biliaires de l'urine. La bile est déléguée par l'alcool et le précipité épuisé ensuite par ce dissolvant. Après évaporation de la solution alcoolique, et reprise du résidu par l'eau, la solution aqueuse est agitée avec de l'éther, qui enlève les graisses et les lipoides. On élimine, par le nitrate de baryum, les acides gras, les savons et les traces de protéines éventuellement présentes, puis les sels biliaires sont précipités par l'acétate de plomb ammoniacal. Le précipité plombique est traité par l'alcool bouillant et la solution, filtrée à chaud, est évaporée à sec après addition de carbonate de soude. Le résidu est épuisé par l'alcool absolu et la solution évaporée de nouveau. Un dernier traitement par l'eau donne une solution qui est filtrée et évaporée jusqu'à poids constant.

2° *Méthode de Hoppe-Seyler* [147]. — La bile (10 à 30 cm³) est évaporée à 110° jusqu'à poids constant et le résidu

(1) En décrivant l'analyse de la bile, Hoppe-Seyler [147] insiste sur l'entraînement des phosphatides par les sels biliaires, et des sels biliaires par les phosphatides. Il conclut par cette phrase : « Wir besitzen zur Zeit keine brauchbare Methode für die Bestimmung der einzelnen Gallenbestandteile ».

traité par l'alcool absolu bouillant. Après 24 heures, la solution est filtrée et évaporée à sec. Le résidu est repris par un faible volume d'alcool, et les sels biliaires précipités par un grand excès d'éther, en présence duquel ils cristallisent; ils sont recueillis et pesés après dessiccation.

On peut également doser, d'une part l'acide taurocholique, et d'autre part l'acide glycocholique. On dissout pour cela dans l'eau le précipité précédent et, dans une portion aliquote, on dose le soufre de l'acide taurocholique. Une autre portion est additionnée de baryte et chauffée pendant une douzaine d'heures à 110-120°, au bain d'huile (dans un tube scellé). Après élimination de la baryte par un courant de CO_2 , la solution est concentrée et acidifiée par l'acide chlorhydrique en présence d'éther. L'acide cholalique cristallisé est recueilli au bout de quelques jours, séché et pesé. De la quantité de soufre trouvée, on déduit la proportion d'acide cholalique provenant de l'acide taurocholique et on attribue le reste à l'acide glycocholique.

3° *Les méthodes de Stadelmann [277] et de Sokoloff [273]* sont simplement basées sur la pesée de l'extrait alcoolique, repris ou non par l'eau.

4° *Méthode de Croftan [70]*. — L'extrait alcoolique, dilué avec de l'eau, est traité par le sous-acétate de plomb ammoniacal. Le précipité est redissous dans l'alcool chaud et la solution est évaporée.

5° *Méthode de Goodmann [115]*. — La bile (50 cm^3) est chauffée à reflux avec une solution concentrée de potasse, pendant deux heures; puis on extrait le cholestérol par trois agitations avec de l'éther de pétrole. La solution est concentrée et débarrassée des acides gras par le chlorure de baryum. Après lavage du précipité, on concentre la solution, et on la refroidit à l'aide d'un mélange de glace et de sel; l'acide cholalique est précipité par un excès d'acide chlorhydrique et recueilli au bout de deux heures. On le lave et, après dessiccation, on l'extrait par l'acétone dans un Soxhlet, pendant cinq heures. La solution acétonique est enfin évaporée jusqu'à poids constant. D'après Beth [21], cette technique donne de mauvais résultats.

6° *Méthode de von Czyhlarz, Fuchs et von Furth [74]*. — La bile (20 cm^3) est agitée trois fois avec de l'éther et la mucine précipitée par l'alcool. Le résidu est repris par l'eau et la solution

additionnée de potasse. Après 48 heures de chauffage au bain-marie bouillant, la solution diluée est fortement acidifiée par l'acide chlorhydrique. On recueille l'acide cholalique au bout de quelques jours, on le lave à l'eau et on le redissout dans l'alcool chaud. La solution est évaporée, et le résidu repris par l'alcool absolu. Après évaporation, l'acide cholalique est séché à 100° et pesé.

7° *Méthode de Pieltre* [225]. — La bile (desséchée tout d'abord et reprise par l'eau lorsqu'elle est riche en mucines) est diluée et agitée avec de l'éther tant que ce dernier entraîne des substances solubles. On la dessèche ensuite au bain-marie, puis à 40°, et on traite le résidu pulvérisé par l'alcool méthylique, à reflux. La partie insoluble est lavée et conservée: elle est formée de corps étrangers en suspension, de mucines, d'acides libres, de sels minéraux, lesquels peuvent être séparés par lavage à l'eau.

La solution méthylique bouillante est additionnée goutte à goutte d'une solution saturée de méthylate de baryum, qui précipite les pigments. Après carbonatation du filtrat, on distille l'alcool méthylique dans le vide. Le résidu est repris par l'eau, traité par l'éther et séché au bain-marie, puis à l'étuve. Il est formé de la masse des sels biliaires.

On peut d'autre part évaporer l'éther pour doser en bloc les acides gras, les savons, les graisses, les lécithines, les cholestérines, et traiter le précipité barytique par l'acide chlorhydrique pour en extraire les pigments.

8° *Les méthodes indirectes de dosage des sels biliaires sulfurés* par évaluation du soufre seront envisagées plus loin (p. 160).

CHAPITRE II

MÉTHODES BASÉES SUR LA MESURE
DE LA TENSION SUPERFICIELLE

Les plus connus des procédés cliniques de dosage des sels biliaires dans la bile utilisent l'action abaissante de ces sels sur la tension superficielle. C'est surtout pour l'étude de l'urine que ce phénomène a été mis à profit, soit que l'on ait recours à la réaction bien connue de Hay à la fleur de soufre, soit que l'on effectue des déterminations stalagmométriques; aussi la plupart des publications, très nombreuses, faites sur ce sujet, concernent-elles l'examen des urines.

Les variations de la tension superficielle de la bile peuvent être appréciées de quatre manières : à l'aide de la fleur de soufre, par la méthode du tube capillaire, par la méthode de l'arrachement, et surtout par stalagmométrie.

I. — PROCÉDÉS UTILISANT LA RÉACTION DE HAY

La chute de la fleur de soufre, lorsque la tension superficielle du liquide à la surface duquel on la dépose est suffisamment abaissée, a été décrite par Hay en 1882; cette réaction fut introduite en France en 1901, sous le nom de réaction de Haycraft, par Frenkel et Cluzet [102], Chauffard et Gouraud [49]. Son application à l'urine a fait l'objet de multiples travaux portant sur sa sensibilité, sur l'influence des divers constituants, normaux et accidentels, de l'urine, sur les conditions à réaliser pour la pratiquer correctement.

Elle a été utilisée aussi pour l'examen du liquide duodéal

1^{re} *Méthode de Carnot et Mauban* [194]. — Chiray et Lebon [50] en donnent la description suivante : « On répartit une égale quantité d'eau distillée (10 cm³) dans dix tubes à essais rangés dans un porte-tubes. Dans le premier, on dépose une goutte de suc duodéal, deux gouttes dans le second, trois gouttes dans le troisième, et ainsi de suite jusqu'au dixième tube. Un tube supplémentaire servant de témoin, et ne contenant que de l'eau distillée, est ajouté à la série. Puis, le mélange une fois bien

assuré, on laisse tomber dans chaque tube une pincée de fleur de soufre. Celle-ci reste en tas dans le tube témoin, s'étale en surface dans les autres tubes et ne tarde pas à s'immerger et à descendre avec une facilité d'autant plus grande que le liquide a reçu un plus grand nombre de gouttes de liquide duodénal. Il est indispensable de tenir le porte-tubes à la main et de lui imprimer de légères oscillations qui sont ressenties à la fois de la même façon par tous les tubes de la série. Pendant cette manœuvre, il ne faut pas quitter des yeux le tube témoin, car des secousses trop violentes, qui y feraient « neiger » la fleur de soufre, fausseraient naturellement le résultat. Une simple lecture indique comme limite de la réaction le tube où la descente du soufre cesse d'être nettement visible. Normalement, on obtient encore la réaction de Hay dans le tube 1 qui a reçu une goutte de suc duodénal et contient donc une dilution à 1 p. 400. Mais, dans certains cas anormaux, Carnot et Mauban ont trouvé la limite extrême pour une dilution de 1 p. 20.000 et même 1 p. 32.000 ».

Comme le fait remarquer Bariéty [16], ce procédé est plutôt qualitatif que quantitatif et permet surtout de comparer des biles entre elles.

2° *Méthode de Lepehne* [176]. — Elle consiste également à préparer diverses dilutions de bile et à noter jusqu'à quelle dilution on observe, cinq minutes après l'addition de fleur de soufre, l'étalement et la chute de cette dernière. Les degrés de dilution (Gallensäurenzahlen) présentent, même à l'état normal, de grandes variations (bile hépatique: 1/200 à 1 500; bile vésiculaire: 1 500 à 1/2500. Lepehne [177] estime lui-même que cette technique ne fournit que des approximations grossières. Comme dans toutes les méthodes basées sur la tension superficielle, les résultats sont faussés par des phénomènes d'adsorption et par la présence d'autres substances tensio-actives, et en particulier d'amino-acides (Von Schade [255], Müller [205]).

II. — PROCÉDÉ UTILISANT LES TUBES CAPILLAIRES

La hauteur d'ascension d'un liquide dans un tube capillaire est donnée par la formule $h = \frac{2T}{RD}$, dans laquelle h est la hauteur d'ascension, T la tension superficielle, R le rayon du tube, et D le poids spécifique de la solution. R et D étant connus, on peut déduire, de la valeur de h , celle de T . On pourrait ainsi

comparer la tension superficielle de la bile diluée à celle d'une solution titrée de sel biliaire (glycocholate de soude, par exemple), en suivant les indications de Michaelis [201].

Nous n'avons pas rencontré de description d'une telle méthode pour l'examen de la bile. Libert [182] a effectué de cette façon ses analyses de suc duodénal, après défécation par l'alcool et reprise du résidu par l'eau, mais sans préciser, dans sa thèse, le mode opératoire suivi.

III. — PROCÉDÉ DE L'ARRACHEMENT

Ce procédé, dû à Lecomte du Nouy, consiste à mesurer la force nécessaire pour rompre l'adhérence entre un fil métallique, de longueur déterminée, et la surface du liquide dont on veut évaluer la tension superficielle; cette dernière est proportionnelle à la force qu'il faut appliquer. Au dispositif de Lecomte du Nouy, Brinckmann et Van Damm ont substitué une microbalance de torsion à laquelle est adapté un anneau de platine. On note (en poids) la traction nécessaire pour arracher l'anneau mis en contact, à une même température, d'une part avec de l'eau (tension = 73 dynes) et d'autre part avec le liquide étudié.

Pour échapper aux variations de la tension superficielle « dynamique », qui interviennent dans les méthodes stalagmométriques, et ne mesurer que la tension « statique », Goiffon [111] a perfectionné cette méthode, en suspendant une lame métallique au fléau de la microbalance magnétique de Jouan. On trouvera dans le mémoire de cet auteur la technique adoptée et la formule de calcul. En opérant sur des liquides duodénaux [112] dilués au dixième, la tension superficielle la plus faible que Goiffon ait observée est de 34 dynes dans une bile B, et la plus élevée de 52 dynes. La moyenne semble être située autour de 40 dynes. De l'examen des courbes de dilution, le même auteur a cherché à déduire en outre des indications sur la « qualité » des substances tensio-actives.

IV. — PROCÉDÉS STALAGMOMÉTRIQUES

On tire parti de ce fait que la tension superficielle d'un liquide est inversement proportionnelle au nombre de gouttes correspondant à un volume déterminé de ce liquide; on la mesure donc en comptant les gouttes qui s'écoulent d'une pipette spéciale (1).

(1) Cette façon de faire est plus rapide et plus aisée que la pesée des gouttes selon Guye et Perrot [124].

Elle peut être exprimée par le nombre de gouttes obtenu, ou déterminée relativement à celle de l'eau distillée (1000), à l'aide de la formule $TS = 1000 \times \frac{N}{N'} \times D$, dans laquelle N est le nombre de gouttes donné par l'eau distillée, N' le nombre de gouttes donné par la solution examinée, et D la densité de cette dernière. On emploie d'ordinaire en France le compte-gouttes de Duclaux, qui fournit environ 100 gouttes pour 5 cm³ d'eau distillée, tandis que les auteurs allemands utilisent le stalagmomètre de Traube (1).

1° *Méthode de Chabrol et Bénard* [46, 47]). — Cette méthode, qu'ont également employée Gambillard [107] et Bariéty [16], consiste à déterminer tout d'abord le nombre de gouttes (voisin de 100) que donne le compte-gouttes de Duclaux, à l'extrémité supérieure duquel est adapté un tube de caoutchouc permettant d'aspirer les liquides. On dilue la bile de telle sorte que 5 cm³ de dilution fournissent environ 120 gouttes (une par seconde). Un graphique établi expérimentalement, en opérant sur des solutions de glycocholate de soude, indique à quelle concentration en glycocholate correspond la tension superficielle trouvée pour la dilution biliaire. Lorsque le nombre de gouttes est voisin de 120, cette courbe montre en effet des variations très marquées de la tension, suivant le titre des solutions en sels biliaires; d'autre part, à la dilution pratiquée, l'intervention des autres constituants de la bile serait à peu près complètement annulée. Aussi les auteurs estiment-ils que cette méthode permet des évaluations suffisamment approchées, surtout lorsqu'il s'agit de comparer les uns aux autres plusieurs échantillons. Elle est toutefois inutilisable lorsque le liquide duodénal renferme du sulfate de magnésie, qui accentue considérablement la chute de tension superficielle provoquée par les sels biliaires (Gambillard [107]).

2° *Méthode de Beth* [21]. — Dans cette technique, on s'efforce d'éliminer au préalable les substances gênantes. A 30 cm³ de liquide duodénal, on ajoute 90 cm³ d'alcool à 95° et on filtre après dépôt du précipité. Le filtrat, acidifié par 5 cm³ d'acide chlorhydrique 3N, est évaporé au bain-marie jusqu'à 5 à 6 cm³, et ce résidu agité plusieurs fois avec 30 cm³ d'éther. On le concentre de nouveau à 2 ou 3 cm³ et, après refroidisse-

(1) Sur cet appareil et ceux qui en dérivent, voir la monographie de Traube [285].

ment, on ajoute 5 cm³ de soude 3N. La solution est diluée à 50 cm³, puis filtrée. La grosseur des gouttes est mesurée au moyen du visco-stalagmomètre de Traube, maintenu à une température de 20° C. Un graphique établi avec le glycocholate indique la concentration en sels biliaires qui correspond à la valeur trouvée pour la grosseur des gouttes. Ce résultat est conventionnellement exprimé par « un indice d'acides biliaires » (Gallensäurenzahl).

3° *Méthode de Meyer* [200]. — Cet auteur a étudié l'influence, sur la tension superficielle, de divers éléments de la bile (mucus, sels minéraux, savons, acides gras, graisses, lécithine, cholestérol, pigments biliaires, peptones) ainsi que celle de la filtration et de l'adsorption par le charbon. Il a particulièrement insisté sur celle de la réaction du liquide, signalée par plusieurs auteurs (Scheminsky [256], Windisch et Dietrich [337]; voir sur ce point Michaelis [201]). Il estime indispensable de réaliser une dilution et une acidité convenables; la méthode de Beth, dans laquelle on ne tient pas compte de ce dernier facteur, exposerait en outre à des pertes dues à la solubilité des sels biliaires dans l'éther.

Le liquide duodénal est extrait à jeun, en évitant son mélange avec le suc gastrique, puis il est dilué au cinquantième et rendu nettement acide au rouge congo par addition de une ou deux gouttes d'acide chlorhydrique à 15 %. On détermine le nombre de gouttes et on prépare, s'il y a lieu, une nouvelle dilution de bile, afin que ce nombre soit compris entre 105 et 135 gouttes normales (c'est-à-dire que le nombre de gouttes est rapporté à celui que donne un stalagmomètre, de même capacité, fournissant 100 gouttes d'eau). On fait couler au plus 20 gouttes par minute en réglant la vitesse à l'aide d'un tube de caoutchouc adapté à l'extrémité supérieure de l'appareil. De même que dans les méthodes précédentes, un graphique tracé en examinant des solutions de glycocholate fait connaître la teneur en sels biliaires de la dilution analysée.

Par la méthode de Brinkmann et Van Damm, Adler [6] a cherché à apprécier la valeur du dosage stalagmométrique. L'addition de sels biliaires à la bile, à l'urine et au sang, ne modifierait pas d'une manière régulière la tension superficielle; après s'être abaissée, cette dernière se relève en présence d'une dose croissante de ces sels. Sa mesure peut ainsi fournir une réponse négative, alors que les sels biliaires sont abondants. D'autres expériences ont porté sur des solutions colloïdales de cholestérine et

de lécithine, sur les variations de la viscosité et sur l'adsorption des sels biliaires. Adler estime que les méthodes stalagmométriques ne permettent pas des déterminations exactes.

Faute de pouvoir leur consacrer, sans interruption, le temps nécessaire, nous n'avons pas effectué un assez grand nombre d'examen stalagmométriques pour être à même de juger, avec chiffres à l'appui, de la valeur de ces méthodes; elles ne se prêtaient d'ailleurs pas à l'analyse de nos liquides duodénaux, riches en sulfate de magnésic. De quelques essais comparatifs faits à l'aide de notre méthode colorimétrique (p. 155) et de ces trois procédés, il semble du moins résulter que ce soit celui de Meyer qui donne les chiffres les plus voisins.

Cette question mériterait sans doute une étude systématique, dont le premier stade consisterait à préciser l'influence, sur la tension superficielle, de doses connues de sels biliaires. En confrontant certaines des courbes publiées, on observe en effet des écarts considérables. N'ayant pu tracer la même courbe que Buglia [44], Beth attribue ces divergences à ce fait qu'il emploie le produit de Merck, tandis que Buglia utilisait le glycocholate de soude de Kahlbaum. D'après ce que nous savons des variations de la composition des sels biliaires du commerce, on doit s'attendre, à moins d'avoir recours à un sel pur, à établir autant de courbes différentes que l'on mettra en œuvre d'échantillons différents (1).

(1) Si l'on représente par un graphique les tensions superficielles indiquées par E. et E. Doumer [82], qui examinaient des solutions de glycocholate de soude *du porc*, on obtient une courbe différente de celles qu'ont fournies les glycocholate et taurocholate, d'origine non précisée, employés par d'autres auteurs.

CHAPITRE III

MÉTHODES UTILISANT L'HYDROLYSE
ALCALINE DES SELS BILIAIRES
(DOSAGE GAZOMÉTRIQUE)

Depuis que Demarcay [77] et Strecker [280] ont montré que les acides taurocholique et glycocholique, chauffés en présence d'un alcali, se décomposent en acide cholalique et en taurine ou glycocolle, cette réaction a été étendue aux acides glycocholéinique, taurocholéinique et, d'une manière générale, à tous les acides de ce type, formés de l'association d'un amino-acide et d'un acide biliaire proprement dit. Ce n'est que beaucoup plus récemment que Foster et Hooper [97] ont eu l'ingénieuse idée de tirer parti de ce phénomène pour l'étude de la bile et de substituer, au dosage direct des acides biliaires, le dosage des amino-acides ainsi libérés, pour lequel diverses méthodes étaient utilisables. Les expériences de ces auteurs, qui cherchaient à élucider le métabolisme des acides biliaires, ont porté sur le chien; aussi n'ont-ils envisagé que la bile de cet animal, en admettant que, suivant les données classiques, tous les acides biliaires qui s'y trouvent sont des dérivés de la taurine et que, par conséquent, leur dosage se ramène à un dosage de taurine. Ils ont adopté, pour cette détermination, la méthode gazométrique à l'acide nitreux, instituée antérieurement par van Slyke.

Si l'on admet d'ordinaire que les acides biliaires de la bile de chien ne fournissent dans ces conditions que de la taurine, il n'en est pas ainsi chez les autres animaux, ni chez l'homme. L'hydrolyse libère alors, à la fois, de la taurine et du glycocolle. Pour faire le départ entre le groupe des acides biliaires dérivés de la taurine, parmi lesquels prédomine l'acide taurocholique, et le groupe des acides dérivés du glycocolle, dont l'acide glycocholique est le plus abondant, on peut tenir compte de ce fait que le premier de ces deux amino-acides est sulfuré, tandis que le second ne l'est pas. C'est ainsi que Schmidt et Dart [269] ont modifié la méthode de Foster et Hooper en associant, au dosage de l'azote aminé par la méthode de van Slyke, un dosage pondéral du soufre. Quelques années plus tard, Rosenthal et von Falkenhausen [245] ont proposé une technique identique.

Après avoir brièvement décrit la méthode de van Slyke, nous exposerons ces trois méthodes, dont nous avons conservé le principe pour en établir une quatrième, d'application plus aisée, en considérant à cette occasion, de plus près que ces auteurs ne semblent l'avoir fait, les temps successifs de dosage et les causes d'erreur susceptibles d'intervenir. Ce nouveau mode opératoire a lui-même été amélioré par la suite, grâce à la suppression du dosage des amino-acides préexistant à l'état libre. Ces diverses techniques, qui comportent toutes des déterminations gazométriques, seront rassemblées dans ce chapitre. Nous avons également cherché à substituer à la méthode de van Slyke un procédé colorimétrique (chapitre IV), puis la formol-titration (chap. VI).

I. LE DOSAGE DE L'AZOTE AMINÉ PAR LA MÉTHODE GAZOMÉTRIQUE DE VAN SLYKE

Nous nous bornerons à rappeler les points essentiels de cette méthode. On sait que certains acides aminés réagissent avec l'acide nitreux suivant l'équation: $\text{RNH}^+ + \text{NO}^- + \text{H}^+ = \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$, dans laquelle l'azote aminé et l'azote de l'acide nitreux se dégagent simultanément à l'état gazeux; du fait de ce dégagement, il ne peut s'instituer d'équilibre qui limite la décomposition. Cette réaction a été mise à profit, pour le dosage des groupes aminés, par Sachs et Kormann [252], par König [161] et surtout par van Slyke qui l'a utilisée pour l'étude chimique et biologique des protides. L'appareil de cet auteur, dont on trouvera la description détaillée soit dans les mémoires originaux [290], soit dans le traité d'Abderhalden [289], soit dans une revue publiée dans le *Journal de Pharmacie et de Chimie* [291], comporte les pièces suivantes: une chambre à réaction dans laquelle le produit analysé est mis en présence de l'acide nitreux naissant, obtenu lui-même au moyen de nitrite de soude et de l'acide acétique; une pipette de Hempel formée d'une solution de potasse et de permanganate de potassium, qui absorbe le bioxyde d'azote provenant de la décomposition par l'eau de l'excès d'acide nitreux; une burette graduée qui sert à mesurer le volume de gaz restant. Ce dernier est l'azote libéré dans la réaction, accompagné d'une faible proportion de gaz parasites dégagés par les réactifs et qui est déterminée au cours d'une opération-témoin, sans substance aminée. Etant donnée l'équation précédente, la moitié de cet azote appartient aux groupes aminés. Van Slyke a également établi un micro-appareil

[292] permettant en particulier le dosage de l'azote aminé dans le sang.

A la série de connexions et de robinets qui rendent cet appareil assez délicat, s'ajoute un dispositif d'agitation, en relation avec une trompe à eau ou un moteur électrique, et qui imprime des secousses régulières au flacon-laboratoire et à la pipette.

Dans les conditions précisées par van Slyke, tous les amino-acides ne se comportent pas d'une manière identique et ne cèdent pas quantitativement leur azote; inversement, d'autres substances azotées sont décomposées par l'acide nitreux. De ces constatations, nous ne retiendrons que celles qui doivent être invoquées pour le dosage de l'azote aminé dans la bile, et qui se résument ainsi:

1° Avec tous les amino-acides en α qui ont été essayés, la réaction est intégrale à 20", moyennant 5 minutes d'agitation:

2° L'ammoniaque et la méthylamine demandent, pour perdre tout leur azote, une agitation maintenue pendant 2 heures. Ce temps doit être de 8 heures pour l'urée, et de 2 à 5 heures pour les purines et pyrimidines;

3° Le glycocolle subit une décomposition plus profonde et fournit, avec son azote, des gaz non absorbables par le permanganate alcalin. Par rapport au chiffre théorique, le rendement devient ainsi de 103 %.

II. LES MÉTHODES ANTÉRIEURES DE DOSAGE GAZOMÉTRIQUE DES SELS BILIAIRES

1° *Technique de Foster et Hooper* [97]

On mesure, dans une fiole jaugée de 50 cm³, 5 cm³ de bile de chien clarifiée par centrifugation, puis 40 cm³ d'alcool à 95°. Après avoir porté le mélange à une température voisine de celle d'ébullition, on refroidit et on complète, avec de l'alcool, le volume à 50 cm³. On filtre et on prélève deux portions de 20 cm³ que l'on évapore séparément. Le résidu de la première est repris par l'eau et la solution amenée à un volume de 10 cm³. On dose l'azote aminé *libre* dans 2 cm³ de cette dilution à l'aide de la méthode de van Slyke. Le résidu de la seconde portion est dissous dans 6 cm³ de soude renfermant 8 gr. d'hydrate p. 100; la solution est chauffée au bain-marie bouillant pendant 5 heures, puis amenée à un volume de 10 cm³. En opérant sur 2 cm³, on dose l'azote aminé *total* de la même manière que précédemment.

En multipliant par 2,5 la différence trouvée entre les deux résultats, on obtient l'azote aminé correspondant aux sels biliaires contenus dans 1 cm³ de bile. Pour exprimer des résultats en acide taurocholique, Foster et Hooper multiplient finalement ce chiffre par le coefficient 36,72.

2° *Technique de Schmidt et Dart [269]*

Ces auteurs dosent l'azote aminé libre, puis l'azote aminé total, par la méthode précédente. Les prises d'essais sont toutefois de 10 cm³, le volume d'alcool étant également doublé. On lave en outre à l'alcool le précipité de mucines et l'on porte à 6-8 heures la durée du chauffage en présence de soude.

D'autre part, Schmidt et Dart évaporent 60 cm³ de filtrat alcoolique, correspondant à 6 cm³ de bile, et ajoutent au résidu un mélange, dont ils n'indiquent pas les proportions, de carbonate et de bioxyde de sodium; après fusion et reprise par l'eau, le soufre est dosé par pesée à l'état de sulfate de baryum. Ce soufre étant considéré comme appartenant à la taurine, on en déduit l'azote qui l'accompagne dans la molécule de ce composé. En défalquant le chiffre obtenu de celui qu'a fourni le dosage de l'azote aminé des sels biliaires, on a l'azote du glycocolle, qui est finalement diminué de 3 p. 100 (pour tenir compte du rendement anormal auquel conduit, dans le cas de ce dernier, la méthode de van Slyke). On distingue ainsi, dans l'expression des résultats, l'azote des sels biliaires dérivés de la taurine et l'azote des sels biliaires dérivés du glycocolle. Schmidt et Dart admettent que l'erreur maxima commise, avec cette méthode, est d'environ 6 p. 100 (1).

3° *Technique de Rosenthal et von Falkenhäusen [245]*

Envisageant cette fois l'analyse, non seulement des biles animales, mais aussi du liquide duodénal, ces auteurs utilisent des prises d'essais moins réduites dans ce dernier cas (de 30 à 40 cm³). Les mucines sont précipitées par 10 volumes d'alcool absolu, le contact étant maintenu pendant 24 heures et suivi d'un lavage à l'alcool du précipité. Le dosage de l'azote aminé libre est effectué sur le résidu correspondant à 2 cm³ ou davantage de bile, tandis que celui de l'azote aminé total porte sur 10 cm³ ou moins, après hydrolyse poursuivie pendant 6 heures en présence de 8 p. 100 de soude.

(1) Schmidt et Merrill ont appliqué ensuite ce procédé au dosage des sels biliaires dans l'urine [270].

Le soufre est dosé ici aussi par pesée dans 5 à 10 cm³ de bile, après fusion alcaline du résidu avec un mélange de carbonate de sodium, de carbonate de potassium et de bioxyde de sodium (méthode d'Asboth-Düring). Les calculs sont les mêmes que dans le procédé de Schmidt et Dart, avec cette différence que les résultats sont exprimés en acide glycocholique et en acide taurocholique; les valeurs trouvées pour l'azote du glycocolle et pour l'azote de la taurine sont pour cela multipliées respectivement par les facteurs 33,12 et 36,69 (1).

4° Comparaison de ces trois techniques

On constate ainsi que:

1° Tous ces auteurs défèquent la bile par l'alcool fort, soit à chaud, soit à froid, et en lavant ou non ensuite à l'alcool le précipité formé.

2° Les sels biliaires sont hydrolysés, au bain-marie, par la soude à 8 p. 100, la durée du chauffage variant de 5 à 8 heures suivant les méthodes.

3° De l'azote aminé dosé dans le liquide d'hydrolyse, on doit, pour connaître l'azote des sels biliaires, déduire l'azote aminé préexistant dans la bile non chauffée.

4° Pour faire enfin une distinction entre le glycocolle et la taurine, on dose d'autre part le soufre dans l'extract alcoolique de bile et on l'attribue à ce dernier acide aminé. Le bien-fondé de cette façon d'opérer sera envisagé dans une autre partie de ce travail (p. 162).

III. ETUDE D'UNE MÉTHODE GAZOMÉTRIQUE DE DOSAGE DES SELS BILIAIRES

Estimant que le principe de ces méthodes devait être retenu, nous avons cherché à l'utiliser à notre tour, mais en évitant de recourir à l'appareil de van Slyke. Afin de justifier l'emploi d'un autre dispositif, nous avons dû envisager successivement le dosage, dans ces nouvelles conditions, des deux amino-acides en cause : glycocolle et taurine, puis celui des sels biliaires eux-mêmes, et enfin l'application de la méthode à l'analyse de la bile et du liquide duodénal. Nous avons ensuite simplifié cette technique, en supprimant le dosage de l'azote aminé libre.

(1) Rosenthal et Wislicki [247] ont proposé ensuite une méthode analogue pour le dosage des sels biliaires dans le sang.

1° DOSAGE GAZOMÉTRIQUE DU GLYCOCOLLE ET DE LA TAURINE

a) *Substitution d'un uréomètre à l'appareil de van Slyke.* — L'appareil de van Slyke est assez fragile, et ne peut être mis qu'entre des mains expérimentées; son usage est en outre peu courant en France. Aussi ne convenait-il guère à nos recherches, qui devaient être effectuées dans un laboratoire d'hôpital. Nous avons adopté le mode opératoire proposé par Bierry, Feuillé, Hazard et Ranc [23], qui emploient pour le dosage des amino-acides un uréomètre à mercure de capacité convenable, et procèdent à peu près de la même façon que pour le dosage classique de l'urée par l'hypobromite; ce dernier est en définitive remplacé par les réactifs de van Slyke. Il nous a semblé préférable encore, étant donné le but que nous poursuivions, de chercher à utiliser des uréomètres à eau du type Ambard-Hallion [8]; de cette manière, pensions-nous, plusieurs dosages pourraient être conduits simultanément.

Les uréomètres de ce genre, que fournissent les constructeurs, possèdent forcément une capacité limitée par la dimension de l'uréomètre lui-même et par celle du capuchon de caoutchouc qu'on lui adapte. On devra donc y introduire des doses de réactifs suffisantes pour libérer entièrement l'azote aminé, sans toutefois que soit gênée l'expansion des gaz dégagés. Nous avons tout d'abord employé le modèle de Clogne, dont la capacité, abstraction faite du capuchon, est d'environ 30 cm³; les deux premiers centimètres cubes sont gradués en 1/20 et les autres, jusqu'à 25 cm³, en 1/10, mais l'appareil ne porte pas de graduations entre 2 et 3 cm³. Nous lui avons substitué ensuite, pour doser de faibles quantités d'azote, l'uréomètre de Grimbert (gradué en dixièmes jusqu'à 5 cm³) muni du capuchon d'Ambard-Hallion. Cinq de ces appareils pouvaient être agités en même temps, et de façon identique, à l'aide d'un dispositif approprié, relié à un moteur électrique.

On ne saurait mettre en œuvre, avec de tels uréomètres, les fortes doses de nitrite de soude et d'acide acétique qu'emploient van Slyke et Bierry. Le premier utilise en effet 28 cm³ d'une solution de nitrite à 30 p. 100 et 7 cm³ d'acide acétique, tandis que le second emploie 16 cm³ de la même solution de nitrite et 4 cm³ d'acide. Avec des quantités aussi grandes, il se fait un dégagement gazeux considérable, qui ne peut trouver place dans l'uréomètre. Encore doit-on ici remarquer que, la réaction étant effectuée en milieu aqueux, la production de bioxyde d'azote ne

peut qu'en être augmentée. Après quelques tâtonnements, nous avons adopté les doses de 2 grammes de nitrite (5 cm^3 d'une solution à 40 p. 100) et de 2 cm^3 d'acide acétique, sous réserve de contrôler que même dilués par l'eau qui remplit l'uréomètre, ces réactifs provoquent une décomposition intégrale des amino-acides considérés.

b) *Dosage du glyocolle en solution neutre.* — Dans un uréomètre garni d'une petite baguette de verre, on a introduit un volume connu d'une solution titrée de glyocolle (1) et 5 cm^3 de solution de nitrite de soude à 40 p. 100; puis l'appareil fut rempli d'eau distillée bouillie (pour en chasser les gaz dissous), de la même façon que pour un dosage d'urée. Après addition de 2 cm^3 d'acide acétique, on a agité pendant 5 minutes et retiré le capuchon en plongeant l'uréomètre sous l'eau. En faisant arriver lentement par l'entonnoir de l'eau bouillie, puis la solution absorbante de van Slyke ($\text{MnO}'\text{K}$ 50 gr., KOH 25 gr., eau q.s.p. 1.000 cm^3), on a observé une diminution rapide du volume gazeux. Lorsque ce dernier ne subit plus de variations, l'uréomètre est entièrement plongé dans une cuve d'eau, à une température connue.

Du volume noté, nous avons déduit celui que donnait un dosage à blanc, sans amino-acide (2). Le volume corrigé fut divisé par deux, ramené à 0" et 760 mm. et le résultat exprimé en milligrammes d'azote. Pour le traduire en glyocolle, il convient de multiplier le chiffre obtenu, non par le coefficient théorique 5,31, mais par le coefficient 5,1507, afin de tenir compte du rendement de 103 p. 100 auquel conduit, comme on l'a vu, la méthode à l'acide nitreux (3).

Le tableau suivant rassemble les résultats obtenus (en mg.) :

<i>Glyocolle introduit</i>	<i>Azote trouvé</i>	<i>Glyocolle trouvé</i>	<i>Erreur p. 100</i>
2	0,377	1.94	— 3.0
5	0,990	5.00	+ 1.8
7	1,450	7.46	+ 6.5
10	1,931	9.94	— 0.6
15	2,876	14.81	— 1.2
15	2,912	15.54	+ 3.6

(1) Glyocolle de Hoffmann-La Roche renfermant 18,6 % d'azote. — Théorie 18,66.

(2) Avec les réactifs employés, ce volume était en général voisin de 0 cm^3 4.

(3) Nous avons parfois négligé cette correction lors de notre publication antérieure sur ce sujet aussi quelques chiffres s'en trouvent-ils modifiés. Nous avons ajouté de plus, dans les divers paragraphes de ce chapitre, des résultats obtenus par la suite.

c) *Dosage de la taurine en solution neutre* (1). — Des expériences identiques ont donné ces résultats (en mg.), le facteur de transformation étant ici le coefficient théorique 8,92.

<i>Taurine introduite</i>	<i>Azote trouvé</i>	<i>Taurine trouvée</i>	<i>Erreur p. 100</i>
5	0.540	4.81	—3.8
5	0.556	4.95	—1
7.5	0.878	7.83	+4.5
10	1.108	9.88	—1.2
12.5	1.347	12.01	—3.9
17.5	1.993	17.77	+4.8
20	2.285	20.38	+1.9
25	2.812	25.08	+0.3
30	3.450	30.77	+2.5

Ainsi que l'avaient établi déjà Foster et Hooper, Rosenthal et von Falkenhausen, la méthode de van Slyke est donc applicable à la taurine. Ces deux premières séries d'essais montrent en outre que, tout simple qu'il soit, ce nouveau mode opératoire donne des résultats suffisamment précis pour le cas qui nous occupe.

d) *Dosage du glycocolle et de la taurine en solution alcaline* — Afin de nous placer dans les mêmes conditions qu'après le chauffage des sels biliaires en présence de soude, nous avons ajouté à nos solutions d'acides aminés 8 p. 100 de NaOH; les solutions étaient neutralisées par l'acide acétique avant d'être introduites dans l'appareil. Nous avons alors constaté que l'acétate de soude s'opposait à la production d'acide nitreux naissant et que tout dégagement gazeux pouvait même faire défaut. L'acétate se comporte vraisemblablement comme un tampon auquel il doit suffire de substituer un sel d'acide minéral fort. Nous avons donc remplacé l'acide acétique, à la fois pour la neutralisation des solutions et pour le dosage lui-même, par l'acide nitrique à 36 Bé dilué au quart. La réaction s'effectue alors régulièrement, comme le montrent ces résultats.

<i>Amino-acide introduit (mg.)</i>	<i>Soude à 8 % (cm³)</i>	<i>Azote trouvé</i>	<i>Amino-acide trouvé</i>	<i>Erreur p. 100</i>
Glycocolle 2	10	0.377	1.94	—3
— 7	5	1.320	6.80	—1.8
— 7	10	1.270	6.54	—6.5
— 10	5	1.800	9.58	—4.2
Taurine 5	5	0.555	4.91	—1.8
— 5	10	0.600	4.95	—1
— 10	5	1.157	10.32	+3.2
— 10	10	1.145	10.21	+2.1

(1) Taurine de Hoffmann-La Roche, renfermant 11,2 d'azote et 25,7 de soufre pour 100. Théorie : 11,2 et 25,6.

Si van Slyke emploie l'acide acétique, c'est pour éviter, dans l'étude des protéides, l'hydrolyse possible de certains composés au contact d'un acide plus fort; aussi indique-t-il de ne pas dépasser, si l'on doit recourir à un acide minéral, une concentration 2 fois normale. Comme la défécation de la bile par l'alcool éliminera la presque totalité des substances protéiques présentes, et comme le dosage lui-même est rapidement effectué, il ne semble pas que la substitution de l'acide nitrique à l'acide acétique doive présenter ici d'inconvénients. L'acide nitrique au quart, qui est environ 3 N, se trouve d'ailleurs dilué par l'eau que contient l'uréomètre, et, en admettant que le volume total soit voisin de 30 cm³, la concentration en acide du mélange devient de l'ordre de 1,6 N, soit N/4.

2° DOSAGE GAZOMÉTRIQUE DES SELS BILIAIRES

Foster et Hooper ayant signalé que l'hydrolyse du taurocholate de soude était complète moyennant un chauffage de 5 heures à 100° avec 3 % de NaOH, les autres auteurs se sont placés dans des conditions analogues, mais sans chercher, semble-t-il, à les préciser. Schmidt et Dart ne mentionnent que deux expériences portant sur l'acide glycocholique isolé ou ajouté à une bile de bœuf, et prolongent l'hydrolyse pendant 6 à 8 heures. En opérant sur l'acide glycocholique, chauffé chaque fois pendant 6 heures, Rosenthal et von Falkenhausen ont obtenu des résultats satisfaisants. Comme cette hydrolyse alcaline constitue le temps essentiel du dosage des sels biliaires, nous nous sommes demandé successivement si la durée optimum du chauffage était bien celle qu'ont donné ces auteurs, si elle ne pourrait pas être réduite pour une dose plus forte en alcali, et si les acides aminés, progressivement libérés, n'étaient pas eux-mêmes décomposés par la soude.

a) *Recherche du temps optimum de chauffage, en présence de 8 p. 100 de NaOH.* — 1° *Acide glycocholique.* — Dans une série de tubes à essais, nous avons introduit 100 mg. d'acide pur dissous dans 5 cm³ d'une solution de soude à 8 p. 100. Tous les tubes furent bouchés avec un tampon de coton et plongés, pendant un temps donné, dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement et neutralisation de l'excès d'alcali, nous avons dosé l'azote aminé comme précédemment et exprimé les résultats en acide glycocholique, en multipliant les chiffres trouvés par le coefficient 32,24; ce coefficient, qui est calculé en tenant compte du rendement anormal du glycocolle, déjà rappelé, est par consé-

quent plus exact que le facteur théorique 33,21. Rosenthal et von Falkenhausen emploient le coefficient 33,12. Voici les chiffres ainsi réunis :

Temps de chauffage	Acide glycocholique introduit (mg.)	Azote trouvé	Acide glycocholique trouvé (Rendement p. 100)
1 heure	100	1.777	57.3
2 heures	100	2.403	77.4
3 —	100	2.934	94.6
4 —	100	3.039	97.9
5 —	100	3.086	99.5
6 —	100	3.216	103.6
8 —	100	3.052	98.4
10 —	100	3.077	97.2

Ces résultats font voir que l'hydrolyse de l'acide glycocholique est d'abord rapide, puis se poursuit lentement. En raison de l'erreur de quelques centièmes que comporte la méthode de dosage, les trois derniers chiffres doivent être considérés comme pratiquement identiques. L'hydrolyse de cette quantité relativement grande d'acide glycocholique, est donc complète au bout de 6 heures de chauffage dans un bain-marie bouillant.

2° *Taurocholate de soude*. — Des essais analogues ont porté ensuite sur le taurocholate décrit page 41. Chaque tube renfermait 100 mg. de sel pur. Le coefficient de transformation est ici 38,46.

Temps de chauffage	Taurocholate introduit (mg.)	Azote trouvé (mg.)	Taurocholate trouvé (Rendement p. 100)
1 heure	100	1.490	57.3
2 heures	100	1.981	76.1
3 —	100	2.072	79.6
4 —	100	2.339	89.9
5 —	100	2.450	94.5
6 —	100	2.580	99.5
8 —	100	2.522	97.9
10 —	100	2.523	97.0

Sans leur être parfaitement superposables, ces chiffres sont voisins de ceux du tableau précédent et montrent, en définitive, qu'après 6 heures de chauffage l'hydrolyse du taurocholate est terminée. Ce temps est un peu supérieur à celui qu'ont indiqué Foster et Hooper, qui ont obtenu, après 5 heures, un rendement de 94,7 à 98,8 p. 100. Il est d'ailleurs à noter que, les tubes ne pouvant être hermétiquement bouchés, une petite quantité d'eau, qui varie légèrement d'une expérience à l'autre, est chassée par évaporation. Quoiqu'on rétablisse, au cours du chauffage, le niveau primitif, la concentration du mélange en soude ne reste

pas tout à fait constante, ce qui ne semble pas présenter d'inconvénient (1).

b) *Influence d'une concentration en alcali plus élevée.* — Quoique Foster et Hooper aient obtenu les mêmes résultats en faisant croître de 8 à 19 p. 100 la teneur du milieu en NaOH, dans leurs expériences sur le taurocholate, nous avons répété ces dernières avec l'acide glycocholique, la dose d'alcali étant doublée (16 p. 100). Les chiffres notés ont été voisins des précédents, et il a fallu maintenir le chauffage pendant 5 heures pour que le rendement soit théorique (102 p. 100). La mise en œuvre d'un grand excès d'alcali ne présente donc pas d'avantage appréciable.

c) *Action de la soude à 8 p. 100 sur le glycolle et la taurine.* — Il était peu vraisemblable que ces amino-acides soient décomposés, car les expériences précédentes eussent alors fourni des résultats constamment trop faibles. Nous avons néanmoins chauffé pendant 6 heures des quantités connues de ces substances en présence de soude à 8 p. 100. Chaque tube était en outre relié avec un second tube garni d'acide sulfurique dilué, afin de fixer l'ammoniaque, éventuellement dégagée. Les solutions sulfuriques étant finalement additionnées de réactif de Nessler, nous n'avons observé que des colorations très faibles, correspondant à des traces minimales d'ammoniaque. D'autre part, les dosages gazométriques ont donné :

Amino-acide introduit (mg.)	Azote trouvé (mg.)	Amino-acide trouvé (mg.)	Erreur p. 100
Glycolle 10.3	2.004	10.5	+ 1.9
— 9.5	1.758	9.3	2.1
Taurine 25.0	2.858	25.4	+ 1.6
— 0.8	1.043	0.3	- 2.0

Il résulte de tous ces essais que la méthode gazométrique ainsi conduite permet de doser les sels biliaires avec une approximation suffisante.

(1) Ayant eu entre les mains, grâce à l'obligeance de M. Fleury, un peu d'hyoglycocholate de soude extrait de la bile du porc, nous n'avons observé qu'une décomposition incomplète, ne libérant que la moitié environ de l'azote total dosé d'autre part par la méthode de Kjeldahl-Pregl. Le produit, soluble dans l'eau, était d'ailleurs précipité par la soude. En le dissolvant dans une bile de teneur connue en sels biliaires, nous n'avons pas obtenu une meilleure hydrolyse. On peut se demander si l'âge du produit, qui était de préparation assez ancienne, suffit à expliquer cette anomalie, ou si le glycocholate de la bile du porc est plus résistant, dans les conditions de l'expérience, que celui des autres biles. En opérant par la suite sur un produit isolé par nous (p. 41) en vue d'essais colorimétriques, nous n'avons pas retrouvé cette particularité ; d'ailleurs la bile de porc ne semble pas se comporter de façon spéciale, lorsqu'on la traite comme il est dit plus loin ; l'addition de soude provoque toujours l'apparition d'un précipité souvent volumineux qui se redissout lorsqu'on chauffe.

3° DOSAGE GAZOMÉTRIQUE DIFFÉRENTIEL DES SELS BILIAIRES
DANS LA BILE

Appliquée directement à la bile, cette méthode fournissait des résultats tout à fait erronés. Les sels biliaires sont en effet accompagnés de diverses substances susceptibles d'entrer en réaction, soit avant, soit après l'hydrolyse alcaline, avec l'acide nitreux. On doit donc tout d'abord les envisager successivement, autant que le permettent nos connaissances sur la composition de la bile.

*A) Intervention de quelques constituants de la bile.**1. Mucines et autres protéines.*

L'intervention de ces substances protéiques était facile à prévoir, puisque, chauffées avec un alcali, elles s'hydrolysent plus ou moins profondément en libérant des acides aminés. Foster et Hooper ont en effet constaté que la bile totale, examinée suivant leur méthode, mais sans défécation préalable, fournit un volume d'azote plus grand que celui auquel conduit l'analyse de la bile débarrassée par l'alcool de ses mucines. Aussi ces auteurs ajoutent-ils, à un volume de bile, 8 volumes d'alcool à 95° et chauffent-ils le mélange presque jusqu'à l'ébullition; après refroidissement, ils complètent à 10 volumes avec de l'alcool, et filtrent. Ils admettent donc que le volume occupé par le précipité est négligeable et que le précipité lui-même ne retient pas de sels biliaires. En raison de l'entraînement des sels biliaires par les précipités d'albumines (Croftan [70], Bang [13]), Schmidt et Dart filtrent le mélange chaud et lavent plusieurs fois avec de l'alcool le précipité restant sur le filtre. Rosenthal et von Falkenhausen effectuent de semblables lavages, mais opèrent la défécation à froid.

Nous avons fait, pour notre part, les expériences suivantes. Les trois modes de défécation ont été appliqués à une même bile de bœuf, de telle sorte que la bile se trouve finalement diluée au dixième. Dans des essais parallèles, les volumes d'alcool étaient réduits de moitié, la bile étant alors diluée seulement 5 fois. Les sels biliaires étant dosés de la manière indiquée dans les résidus d'évaporation des différents filtrats alcooliques, nous avons obtenu des résultats concordants, dont les écarts n'excédaient pas 5 p. 100. Il n'est donc pas indispensable de laver le précipité à l'alcool, ni de tenir compte du volume qu'il occupe. La consommation d'alcool peut être diminuée, et surtout la durée de l'évaporation des filtrats au bain-marie.

On doit en effet se demander si, lorsqu'on évapore une solution alcoolique de sels biliaries, ces derniers ne subissent pas une hydrolyse partielle, même en l'absence d'alcali; le résultat du dosage deviendrait alors inexact puisque l'on obtiendrait ainsi une valeur trop élevée pour l'azote aminé libre, et inversement une valeur trop faible pour l'azote aminé total. Foster et Hooper considèrent cette décomposition comme possible, et Schmidt et Dart, dans une seule expérience portant sur 200 mg. d'acide glycocholique, ont observé que 2 p. 100 de l'azote étaient devenus, du fait de l'évaporation, directement dosables par la méthode de van Slyke. Rosenthal et von Falkenhausen n'ont pas attribué non plus d'influence appréciable à l'évaporation. Nous avons toutefois évaporé au bain-marie des solutions d'acide glycocholique dans l'alcool à 80° (titre sensiblement identique à celui des filtrats alcooliques de bile au 1/5), le volume de chaque solution étant de 25 cm³. Le résidu de chaque évaporation fut repris par la soude à 8 p. 100, puis l'hydrolyse et le dosage furent pratiqués comme il a été dit. Dans des essais parallèles, les mêmes quantités d'acide glycocholique étaient dissoutes dans la soude même, sans passer par l'intermédiaire de la solution alcoolique. Nous avons obtenu ces chiffres:

<i>Acide glycocholique employé (mg.)</i>	<i>Azote trouvé (mg.)</i>	<i>Acide glycocholique trouvé (mg.)</i>	<i>Erreur %</i>
50 avec évaporation	1.535	49.48	—1.0
50 sans —	1.613	52.00	+4.0
100 avec —	3.163	101.97	+1.9
100 sans —	3.256	104.9	+4.9
200 avec —	6.048	194.9	—2.5
200 sans —	6.141	197.9	—1.0

L'évaporation au bain-marie des solutions alcooliques d'acide glycocholique ne cause donc pas d'erreur notable. Il en est vraisemblablement de même en ce qui concerne les autres acides biliaries. On pourrait, pour s'en assurer, évaporer des filtrats alcooliques de bile, les uns au bain-marie, les autres dans le vide et à froid. Mais comme des dosages portant sur des volumes différents d'un même filtrat alcoolique (voir plus loin), et partant d'une évaporation plus ou moins longue, fournissent les mêmes résultats, nous considérons cette cause d'erreur comme négligeable.

2. *Urée.* — Les traités de biochimie signalent que la bile renferme une petite quantité d'urée, et Oppenheimer [215] ajoute que le taux de cette substance est plus élevé dans la bile de raie et de requin. Dans une bile de chien, Marshall et Davis

[191] ont trouvé 0 g. 32 d'urée par litre; en étudiant une micro-méthode de dosage, Gad Andresen [106] a rencontré, dans une bile, 0 g. 165 d'azote uréique par litre, soit 0 g. 35 d'urée. En ce qui concerne le liquide duodénal, Auguste [11] a obtenu, chez des sujets normaux, des chiffres compris entre 0 g. 059 et 0 g. 091 d'azote uréique (xanthidrol), ce qui correspond à 0,126-0,195 g. d'urée. Chez des urémiques, les valeurs observées atteignaient 0 g. 183 à 0 g. 692 d'azote uréique, soit de 0,39 à 1,48 g. d'urée. Le même auteur a dosé d'autre part l'azote hypobromite, dont l'azote uréique ne constitue que de 40 à 70 p. 100; la différence n'est que partiellement comblée par l'azote ammoniacal et il subsiste une importante fraction d'azote non dosé (sans doute aminé) (1). Nous avons dosé également l'urée dans trois biles de bœuf et dans trois liquides duodénaux par la méthode pondérale de Fosse et en désalbuminant les échantillons à l'aide de l'alun potassique suivant les indications de Maillard et Wundschendorff [188]; les chiffres trouvés étaient compris entre 0 g. 20 et 1 g. par litre.

Quant à l'erreur en excès résultant de la présence d'urée dans la bile, elle ne peut être *a priori* que peu marquée, car van Slyke a observé que, dans les conditions habituelles de son dosage de l'azote aminé, l'urée cède seulement 3 p. 100 de son azote. Aussi son influence n'a-t-elle pas été envisagée par les auteurs déjà cités, lorsqu'ils ont institué des méthodes gazométriques.

Nous avons cependant cherché à l'apprécier, étant donné que nous n'utilisons pas la technique même de van Slyke, mais une méthode qui en dérive, et dans laquelle les doses de réactif et leur concentration sont profondément modifiées.

Lorsqu'on dose l'azote aminé préexistant dans la bile non chauffée, la totalité de l'urée que contient cette bile peut entrer en réaction avec l'acide nitreux. Nous avons donc introduit dans l'uréomètre des quantités connues d'urée, ajouté les mêmes réactifs que lors du dosage des acides aminés et poursuivi l'opération comme d'ordinaire (avec 5 minutes d'agitation). Nous avons obtenu ces résultats:

Urée introduite (mg.)	Azote uréique correspondant (mg.)	Azote dégagé (mg.)	Azote dégagé % d'azote uréique
5	2,33	0,043	1,84
10	4,66	0,086	1,84
20	9,32	0,180	1,93
20	9,32	0,250	2,68
40	18,64	0,500	2,68

(1) Une élimination biliaire accrue, chez les urémiques, d'urée et d'azote résiduel, a de même été notée par S. Cytronberg [73].

Le pourcentage d'azote libéré n'atteint donc pas ici 3 p. 100; il n'y avait pas intérêt à maintenir l'agitation plus longtemps que dans les dosages de sels biliaires. En admettant ce chiffre de 3 p. 100, on peut calculer ainsi l'erreur commise par exemple dans l'analyse d'une bile qui renfermerait 1 g. d'urée par litre, si le dosage est fait sur 5 cm³ de bile; cette prise d'essai apportera 2 mg. 33 d'azote uréique, et le poids de l'azote libéré atteindra seulement 0 mg. 07. L'erreur finalement produite est en moins, puisque ce raisonnement porte sur le dosage de l'azote aminé préexistant, et ne sera que de 0 g. 45 d'acide glycocholique par litre, à supposer que le résultat soit exprimé sous cette forme.

Cette erreur se trouverait obligatoirement corrigée si elle se produisait également au cours du dosage, après hydrolyse de l'azote aminé total, car elle affecterait également les deux termes de la soustraction. Il ne saurait en être ainsi, *a priori*, puisque le chauffage en milieu alcalin transforme l'urée en carbonate d'ammoniaque et que, en outre, l'ammoniaque de ce dernier sel se trouve déplacée par la soude. Nous avons toutefois vérifié, par les expériences suivantes, que cette décomposition était pratiquement complète dans les conditions de nos dosages et que, par conséquent, l'urée présente dans la bile ne pouvait intervenir, comme il vient d'être dit, qu'au cours de la première évaluation de l'azote aminé par la réaction de van Slyke. Une quantité connue d'urée ayant été dissoute dans la soude à 8 p. 100, la solution fut chauffée au bain-marie pendant 6 heures, puis amenée à un volume déterminé; dans des portions adéquates du liquide, nous avons dosé, d'une part, en bloc, l'azote uréique et l'azote ammoniacal à l'aide de l'hypobromite et, d'autre part, l'azote ammoniacal seul par formol-titration après avoir chassé CO² par ébullition en milieu sulfurique. Nous connaissions ainsi, du moins approximativement, la proportion d'urée décomposée par un semblable traitement, et aussi la dose d'ammoniaque qui subsiste dans la solution au bout de 6 heures de chauffage. Deux de ces essais ont fourni les chiffres suivants:

Urée introduite (mg.)	Azote uréique correspondant	Azote uréique + ammoniacal dosé après chauffage	Azote ammo- niacal	Azote uréique
25	11 65	3 63	2 00	1 63
10	4 66	0 60	0 27	0 33

A la fin de l'hydrolyse ainsi conduite, il ne reste donc à l'état d'urée que 14 p. 100 et 8 p. 100 de la dose primitivement in-

troduite. Quant à l'azote ammoniacal qui l'accompagne, il ne provient pas d'une hydrolyse de l'urée pendant l'élimination de CO_2 par ébullition après addition d'acide sulfurique, car des essais-témoins ont montré que, pendant cette opération très brève, l'urée était pratiquement inattaquée. Alors qu'au début de l'hydrolyse alcaline de l'urée, l'azote ammoniacal formé est rapidement déplacé par la soude, il en subsiste une certaine proportion à la fin du chauffage, du fait qu'à ce moment l'hydrolyse de l'urée n'est pas elle-même terminée.

Lorsque la bile analysée renfermera une dose faible d'urée, cette substance ne troublera donc que dans une mesure négligeable le dosage de l'azote aminé préexistant et sera décomposée à peu près intégralement pendant l'hydrolyse alcaline des sels biliaires; quand cette dose d'urée sera plus importante (et l'on peut remarquer que, pour avoir affaire, en opérant par exemple sur 5 cm³ de bile, aux quantités d'urée qui figurent dans ces essais, il faudrait que la bile en contienne 5 g. et 2 g. 50 par litre), le résultat du dosage de l'azote avant l'hydrolyse n'en sera encore que peu modifié, et il pourra subsister, dans la solution alcaline, après chauffage, une petite quantité d'azote ammoniacal provenant de l'urée. Quelle pourra être l'influence de cet azote ammoniacal sur le dosage de l'azote aminé selon van Slyke?

3° *Sels ammoniacaux.* — Ce n'est pas seulement cet azote ammoniacal, d'origine urémique, qu'il convient d'envisager, mais encore et surtout celui des sels ammoniacaux déjà présents dans la bile elle-même, et dont les auteurs des méthodes gazométriques antérieures ne se sont pas préoccupés. Sur l'ordre de grandeur des quantités susceptibles d'être rencontrées, nous n'avons pas trouvé de précision dans les travaux anciens. A l'occasion des recherches déjà mentionnées sur la composition du liquide duodénal, Auguste [11] a dosé, chez les urémiques, de 0 g. 025 à 0 g. 128 d'azote ammoniacal par litre.

Au cours du dosage de l'azote préexistant, tous les sels ammoniacaux apportés par la bile pourront être attaqués par l'acide nitreux. D'après van Slyke, ce n'est qu'après deux heures d'agitation dans son appareil qu'ils cèdent tout leur azote. Nous avons étudié leur décomposition dans les conditions de nos dosages, en utilisant des solutions titrées de sulfate ou de chlorhydrate d'ammoniaque.

<i>Azote ammoniacal introduit</i> (mg.)	<i>Azote trouvé</i> (mg.)	<i>Pourcentage d'azote</i> <i>libéré</i>
2.5	0.138	5.5
5.0	0.288	5.7
8.55	0.560	6.5
10.0	0.634	6.3

Ces sels fournissent donc, dans l'uréomètre, environ 6 p. 100 de leur azote. Soit par conséquent une bile renfermant environ 0 g. 25 d'azote ammoniacal par litre, et dont l'analyse est faite sur 5 cm³. Cette prise d'essai apportera 1 mg. 25 d'azote ammoniacal et l'azote surajouté de ce fait à celui des acides aminés préexistants sera d'environ 0 mg. 07; l'erreur finalement commise par défaut correspondra ici encore à 0 g. 45 d'acide glycocholique par litre.

Cet azote ammoniacal, que nous appellerons « préformé » pour le distinguer de celui qui provient de l'hydrolyse de l'urée, ne sera lui-même plus retrouvé lors du second dosage, après un chauffage de 6 heures en milieu alcalin. Nous avons en effet chauffé pendant des temps variant de 1 à 6 heures des solutions de soude à 8 p. 100 additionnées chacune de 1 mg. d'azote ammoniacal. Nous avons ensuite recherché l'ammoniaque restante, non à l'aide du réactif de Nessler qui est inutilisable en pareil cas, mais au moyen de la réaction de Berthelot-Lex étudiée par nous en une autre occasion [71]. Dans le tube chauffé pendant une heure, nous avons dosé encore 0 mg. 45 d'azote ammoniacal; cette quantité est tombée à 0 mg. 22 au bout de 2 heures et à 0 mg. 05 au bout de 3 heures. Quant aux tubes suivants, ils ne retenaient plus que des traces indosables d'ammoniaque et la réaction était parfaitement négative dans le tube chauffé pendant 6 heures. L'azote ammoniacal subsistant à la fin de l'hydrolyse alcaline ne pourra donc appartenir aux sels ammoniacaux préexistants dans le tube, ni résulter de la décomposition des amino-acides (p. 63), mais sera fourni par l'hydrolyse de l'urée; encore ne reste-t-il, comme on l'a vu, que l'azote ammoniacal formé à la fin du chauffage, et dont 6 p. 100 seulement passeront à l'état gazeux sous l'action de l'acide nitreux.

4° *Acides aminés libres.* — Il semble qu'à côté des acides aminés engagés dans la molécule des sels biliaires, il existe dans la bile des acides aminés libres. Aussi Foster et Hooper, Rosenthal et von Falkenhausen, etc., ont-ils dû en tenir compte dans l'établissement de leurs méthodes gazométriques.

Comme on l'a vu, ils appliquent la méthode de van Slyke à la bile désalbuminée, mais non chauffée, puis à la bile chauffée en présence de soude. Le premier de ces dosages leur donne l'azote aminé préexistant à l'état libre et le second l'azote aminé total, c'est-à-dire la somme de l'azote aminé préexistant et de l'azote aminé provenant de l'hydrolyse des sels biliaires. On obtient enfin ce dernier azote en soustrayant le premier résultat du second. Comme, ainsi que nous l'avons vérifié (p. 63), le glyocolle et la taurine ne sont pas décomposés au cours de l'hydrolyse, cette façon de procéder est légitime; on peut, il est vrai, penser que d'autres acides aminés que ceux-ci se rencontrent dans la bile à l'état libre (1), et ensuite qu'il existe des sels biliaires, encore inconnus, qui dérivent d'autres acides aminés. En l'absence de renseignements sur ce point, il semble que l'on doive s'en tenir à cette conception classique, ce que nous avons fait pour notre part en effectuant tout d'abord, ainsi que ces auteurs, des dosages gazométriques différentiels. Si d'ailleurs, comme il est vraisemblable, ces amino-acides indéterminés se comportent de la même manière que le glyocolle et la taurine, leur présence possible dans la bile ne saurait infirmer en rien cette technique, puisqu'ils interviendront pareillement dans les deux temps de l'opération (2).

Des résultats rassemblés par Schmidt et Dart et par Rosenthal et von Falkenhausen, on ne saurait dégager aucun rapport fixe entre l'azote dosable avant hydrolyse et l'azote dosable après hydrolyse. En raison de l'erreur que peuvent faire commettre, dans le premier dosage, les autres substances azotées associées aux amino-acides, nous nous sommes de bonne heure abstenu de chercher à isoler, dans nos analyses, les chiffres correspondant à l'azote aminé préexistant, et que l'on obtient en défalquant du dégagement gazeux observé celui que donnent les réactifs eux-mêmes.

(1) On aurait trouvé, dans la bile, des traces de leucine et de tyrosine dans l'atrophie aiguë du foie. O. V. Fürth [105].

(2) Nous avons fait en passant l'observation suivante : les biles hydrolysées donnent avec intensité la réaction de Berthelot-Lex. Cela ne saurait surprendre, puisque Thomas [284] a montré qu'outre l'ammoniaque, le glyocolle et la taurine fournissent cette réaction. Nous avons toutefois comparé, à ce point de vue, ces trois composés en opérant de telle façon que la même quantité d'azote (0 mg. 5) intervint dans les trois cas. L'ammoniaque, sous forme de sulfate, a alors donné une réaction intense, la taurine a réagi plus lentement, mais tout aussi nettement ; avec le glyocolle, par contre, il ne s'est développé qu'une faible coloration. Les deux amino-acides considérés ne se comportent donc pas, dans cette réaction, d'une manière identique.

Après avoir recouru à la méthode différentielle, nous avons d'ailleurs supprimé par la suite (p. 83) le dosage de l'azote titrable avant hydrolyse.

5° *Autres composés azotés.* — Les auteurs qui se sont occupés du dosage gazométrique n'envisagent que l'intervention de l'urée, de l'acide urique et des phosphatides; celle de l'urée a été étudiée plus haut. Nous n'avons pas trouvé d'indications sur la teneur possible de la bile en acide urique; selon Rosenthal et von Falkenhausen, cet acide ne fournit pas de dégagement sensible dans l'appareil de van Slyke. Quant aux phosphatides, dont le taux (du moins en ce qui concerne la lécithine) est mentionné dans les tableaux des pages 31 et suiv., ces mêmes auteurs font remarquer que l'azote de la choline n'est pas libéré par l'acide nitreux, non plus que celui de la triméthylamine résultant de l'hydrolyse de la choline.

Une cause d'erreur qui ne semble pas avoir été prévue, et dont l'importance éventuelle est difficile à apprécier, peut tenir à l'élimination de médicaments par la bile. Abstraction faite des expériences destinées à établir un mode d'exploration fonctionnelle (tétra-chloro-phthaléine, bleu de méthylène, indigo-carmin, salicylate), on ne possède sur ce point que peu de renseignements. Sans doute conviendra-t-il de ne pas effectuer de semblables dosages après absorption de médicaments dont la formule comporte des groupements aminés susceptibles de céder leur azote sous l'action de l'acide nitreux (1).

B) *Analyse gazométrique de solutions de composition connue.*

Pour apprécier l'influence des divers constituants azotés de la bile, tout en vérifiant l'exactitude des résultats obtenus avec les acides aminés et les acides biliaires considérés isolément, nous avons dosé l'azote, avant et après hydrolyse, dans des solutions de composition déterminée, et dont certaines renfermaient de l'urée et des sels ammoniacaux. Voici, tout d'abord, la composition de ces solutions (en grammes, par litre):

- Solution A. — Glycocolle 0.50 ; glycocholate de sodium 10 g.
 — B. — Glycocolle 2.015 ; glycocholate de sodium 6.00.
 — C. — Taurine 0.25 ; taurocholate de sodium 8.00.
 — D. — Glycocolle 0.50 ; glycocholate de sodium 10.00.
 Taurine 0.25 ; taurocholate 8.00.

(1) Les autres constituants de la bile, tels que l'acide oxalique (Salkowski [253]) l'acide glycuronique (Bial [22]), etc., ne sauraient apporter aucune perturbation.

- Solution E. — Glycocolle 1.63 ; glycocholate 6.00.
 Urée 0.39 ; sulfate d'ammoniaque 1.00.
 (soit 0.181 d'Az uréique et 0.212 d'Az ammoniacal).
 — F. — Taurine 2.00 ; glycocholate 20.
 Urée 1.00 ; sulfate d'ammoniaque 1.00.
 (soit 0.466 d'Az uréique et 0.212 d'Az ammoniacal).

Ces solutions furent diluées au cinquième avec de l'alcool à 95°, de façon à être rendues comparables à des filtrats alcooliques de bile. Puis nous avons prélevé de chaque dilution deux portions identiques (de 5 à 25 cm³) qui furent évaporées au bain-marie. Chacun de ces résidus fut repris par 10 cm³ d'une solution de soude à 8 p. 100; l'une de ces deux solutions fut neutralisée et introduite directement dans l'uréomètre pour le dosage de l'azote aminé *libre*, la seconde étant chauffée au bain-marie pendant 6 heures, puis neutralisée pour le dosage de l'azote aminé *total*; l'azote des sels biliaires était finalement obtenu par différence.

Ces essais ont fourni les résultats rassemblés dans ce tableau (en grammes par litre de la solution primitive):

Solution	Az aminé libre introduit	Az aminé libre trouvé	Az aminé total calculé	Az aminé total trouvé	Az am. des sels biliaires trouvé	Azote des sels biliaires calculé
A	0.093	0.099	0.380	0.400	0.301	0.287
B	0.389	0.341	0.561	0.524	0.183	0.172
C	0.028	0.026	0.236	0.226	0.200	0.208
D	1.121	0.129	0.616	0.636	0.507	0.495
E	0.304	0.309	0.476	0.480	0.171	0.172
F	0.224	0.248	0.798	0.830	0.582	0.574

La comparaison des chiffres des deux dernières colonnes montre les écarts que l'on pouvait prévoir en raison du défaut de précision du dosage gazométrique ainsi pratiqué. Elle autorise à décrire ainsi le dosage gazométrique des sels biliaires dans la bile et le liquide duodénal.

C) Technique du dosage différentiel des sels biliaires.

1° Réactifs nécessaires

- Solution aqueuse de nitrite de soude à 40 p. 100;
- Acide nitrique à 36° Bé dilué au quart (en volumes);
- Solution aqueuse de soude (en plaques) à 8 p. 100 (1);

(1) En l'absence d'acide-amino, ces réactifs donnent un dégagement gazeux appréciable. Comme on en utilise les mêmes quantités dans les deux dosages, portant eux-mêmes sur un volume identique de bile, il est toutefois inutile de faire un dosage « à blanc ».

d) Solution alcaline de permanganate de potasse renfermant, par litre, 50 gr. de MnO^4K et 25 gr. de KOH .

e) Alcool caprylique (1).

2° Mode opératoire

A. — DÉFÉCATION ALCOOLIQUE

A 20 cm^3 de bile ajouter, peu à peu, et en agitant, 60 cm^3 d'alcool à 95°, puis chauffer jusqu'à une température voisine de l'ébullition. Filtrer sur un petit filtre sec et laver à plusieurs reprises le précipité avec de l'alcool chaud. Laisser refroidir le filtrat et compléter, avec de l'alcool, son volume à 100 cm^3 (2).

B. — DOSAGE DE L'AZOTE AVANT HYDROLYSE

Evaporer au bain-marie, dans une capsule, 25 cm^3 de filtrat, correspondant à 5 cm^3 de bile (3). Dissoudre le résidu dans 5 cm^3 de soude à 8 p. 100 préalablement neutralisés, en présence de phtaléine, à l'aide d'acide nitrique dilué. En ajoutant quelques gouttes de la solution de soude, donner au mélange une réaction légèrement alcaline. Le verser dans l'uréomètre, garni d'un petit agitateur, en lavant ensuite la capsule avec un peu d'eau bouillie. Ajouter 5 cm^3 de la solution de nitrite, puis une goutte d'alcool caprylique et remplir l'appareil avec de l'eau bouillie de la même manière que pour un dosage d'urée, c'est-à-dire en comprimant le plus possible le capuchon de caoutchouc. Introduire par le robinet 2 cm^3 d'acide nitrique dilué et agiter l'uréomètre pendant cinq minutes (4); le déboucher en plongeant le capuchon dans un grand verre à expériences rempli d'eau et

(1) L'alcool amylique ne doit pas être employé pour empêcher la production d'une mousse qui gênerait les mesures, car il possède une tension de vapeur appréciable (van Slyke); l'alcool caprylique, dont des traces suffisent, ne présente pas cet inconvénient.

(2) En traitant ainsi des liquides extraits après injection dans le duodénum de sulfate de magnésie, on observe, dans le filtrat alcoolique, la formation de fines aiguilles de ce sel. Elles peuvent être éliminées par filtration ou simplement réparties par agitation dans le liquide sans que les résultats s'en trouvent modifiés.

Lorsqu'on ne dispose que d'un faible volume (liquide duodénal), on peut n'opérer que sur 10 cm^3 , n'ajouter que 30 cm^3 d'alcool et compléter à 50 cm^3 . Il en est de même pour les biles vésiculaires, généralement riches en sels biliaires, et pour l'analyse desquelles on n'utilise par la suite qu'un faible volume de filtrat.

(3) Si l'on s'attend à trouver une dose élevée de sels biliaires, n'évaporer que 10 ou 15 cm^3 de filtrat correspondant à 2 ou 1 cm^3 de bile.

(4) Le dégagement de bioxyde d'azote, qui continue à se manifester, n'a évidemment aucun intérêt. Il convient que le capuchon ne soit pas distendu par les gaz; si cela se produit, le dosage n'est pas manqué pour autant, pourvu que le liquide occupe encore un certain volume dans l'uréomètre au-dessus du capuchon.

laver plusieurs fois le gaz avec de l'eau bouillie, en évitant toute rentrée d'air; faire arriver ensuite, par petites quantités, de la solution de permanganate jusqu'à ce que le volume gazeux, qui diminue peu à peu, reste fixe. Laver l'azote avec de l'eau bouillie et transporter l'uréomètre dans une cuve pleine d'eau. Noter au bout d'un quart d'heure le volume gazeux N en cm^3 .

C. — DOSAGE DE L'AZOTE APRÈS HYDROLYSE

Evaporer d'autre part le reste du filtrat alcoolique (50 cm^3 , correspondant à 10 cm^3 de bile) (1). Dissoudre le résidu dans 10 cm^3 de soude à 8 p. 100, employés en plusieurs fois, en réunissant les liquides dans un tube à essais jaugé à 10 cm^3 et que l'on bouche ensuite avec un tampon de coton. Chauffer le tube au bain-marie bouillant pendant 6 heures. Après refroidissement, rétablir le volume primitif avec de l'eau distillée. Neutraliser comme précédemment 5 cm^3 de la solution, ce qui correspond à 5 cm^3 de bile, et introduire le liquide dans un uréomètre avec 5 cm^3 de solution de nitrite et une goutte d'alcool caprylique. Continuer le dosage comme ci-dessus. On note ainsi un volume N' et on inscrit aussi la température de l'eau de la cuve et la pression atmosphérique.

Comme la réaction de van Slyke fournit un volume d'azote *double* de celui qu'apportent les amino-acides, la différence $N' - N$ correspond à l'azote des sels biliaires contenus dans 10 cm^3 , 4 cm^3 ou 2 cm^3 de bile, suivant que l'on a opéré sur des volumes de filtrat et de liquide d'hydrolyse correspondant eux-mêmes à 5 cm^3 , 2 cm^3 ou 1 cm^3 de bile. Pour faciliter les calculs et exprimer les résultats en poids, nous avons établi le tableau et la formule que voici:

1° Le tableau qui figure en appendice à la fin de ce travail (p. 185) est directement utilisable *lorsqu'on a effectué les dosages sur 5 cm^3 de bile* (2).

Ayant obtenu la différence $N' - N$ en cm^3 , on multiplie ce chiffre par le coefficient qu'indique le tableau, à l'intersection de la ligne horizontale (température) et de la colonne verticale

(1) N'évaporer comme précédemment qu'un volume très faible (10 ou 5 cm^3) si la bile est très riche en sels biliaires.

(2) Si le dégagement gazeux est trop abondant, on dispose des 5 cm^3 restants pour faire un nouveau dosage sur un volume plus faible de liquide, sans répéter l'hydrolyse; il suffit de doser l'azote aminé libre dans un volume de bile correspondant.

(pression atmosphérique). On obtient ainsi, en grammes par litre, l'azote des sels biliaires que renferme la bile analysée.

Exemple: $N' - N = 3 \text{ cm}^3$; $T = 20^\circ \text{ C}$; P.A. = 750 mm.

Le tableau indique le coefficient 0.1119.

Azote des sels biliaires = $3.6 \times 0.1119 = 0,402$ gr. par litre.

2° Lorsque le dosage a porté sur un volume de filtrat et de liquide d'hydrolyse correspondant à $V \text{ cm}^3$ de bile, on recherche de même le coefficient convenable, dans le tableau, et on applique cette formule:

$$\frac{(N' - N) \times \text{coefficient} \times 5}{V} = \text{Azote des sels biliaires (en g.) par litre de bile.}$$

Exemple: Dosage avant hydrolyse fait sur 10 cm^3 de filtrat, soit 2 cm^3 de bile. Evaporation de 20 cm^3 de filtrat (4 cm^3 de bile) et en dosage de l'azote aminé total dans la moitié du liquide d'hydrolyse (2 cm^3 de bile). $N' - N = 5,8 \text{ cm}^3$; $T = 14^\circ \text{ C}$; P.A. = 768 mm.

Le tableau indique le coefficient 0.118.

On a donc :

$$\frac{5,8 \times 0,118 \times 5}{2} = 1,71 \text{ d'azote par litre}$$

Dans l'état actuel de nos connaissances sur la constitution du groupe des sels biliaires présents dans la bile, il semble préférable d'exprimer les résultats en *azote*. Pour les comparer plus aisément avec ceux que reproduisent la plupart des auteurs, on peut toutefois les traduire autrement, à la condition de ne pas perdre de vue le caractère conventionnel de ce nouveau mode d'expression. On supposera pour cela que tout l'azote des sels biliaires se trouve sous forme d'acide glycocholique, ou de glycocholate de soude, ou d'un autre composé; ou bien qu'il se distribue également entre les glycocholates et les taurocholates; on pourra encore le considérer comme combiné au seul acide cholalique, élément commun à ces deux groupes de sels, et exprimer le résultat en acide cholalique. Comme tous ces composés possèdent des poids moléculaires assez voisins, les coefficients de trans-

formation seront eux-mêmes peu différents les uns des autres. En voici la liste:

$Az \times 32.24 =$	Sels biliaires exprimés en	acide glycocholique (1)
$Az \times 36.78 =$	—	acide taurocholique
$Az \times 35 =$	—	acide glyco-taurocholique
$Az \times 34.84 =$	—	glycocholate de Na (1)
$Az \times 38.46 =$	—	taurocholate de Na
$Az \times 36.6 =$	—	glyco-taurocholate de Na
$Az \times 29.14 =$	—	acide cholalique

4° DOSAGE GAZOMÉTRIQUE EN UN TEMPS DES SELS BILIAIRES DANS LA BILE

En faisant un assez large usage de la méthode précédente, nous avons été amené à lui reconnaître un double inconvénient. Lorsqu'on doit examiner un certain nombre d'échantillons, on est tout d'abord astreint à une série importante de déterminations, qu'il serait pratiquement avantageux de réduire. La seconde objection est plus théorique et s'applique en principe à toutes les méthodes par différence: il est évident en effet que l'exactitude du résultat final est subordonnée à celle des deux dosages nécessaires, et que, dans le cas présent, une erreur commise dans le dosage de l'azote avant l'hydrolyse aura une influence appréciable sur la valeur obtenue en dernier lieu. Or, ce dosage est précisément le plus délicat des deux, puisqu'il porte sur un mélange de divers corps azotés (urée, ammoniacque, amino-acides, etc.), en proportions très variables. Nous avons donc cherché à réduire le dosage à une évaluation de l'azote aminé fourni par l'hydrolyse des sels biliaires et à substituer à la méthode différentielle une technique « en un temps » à la fois plus rapide et plus sûre.

On pouvait, pour cela, soit isoler quantitativement les sels biliaires avant de les hydrolyser, soit éliminer les autres substances azotées décomposables par l'acide nitreux.

1° *Essais d'isolement des sels biliaires.* — Ayant été infructueux, ces essais n'exigent pas un compte rendu détaillé. On ne peut utiliser l'insolubilité qui, pour certains auteurs, n'est pas absolue et peut être modifiée par la présence de lipides et de sels biliaires dans l'éther, car les autres composés azotés se trouvent entraînés et les purifications rendues nécessaires s'accompagnent de pertes considérables. Quelles que soient les conditions réa-

(1) Sur le calcul de ces coefficients, voir p. 55 (rendement du glycocolle en Az dans la réaction de van Slyke).

lisées, nous ne sommes pas parvenu à précipiter intégralement les sels biliaires à l'état de combinaisons plombiques, mercuriques ou barytiques; ce que l'on sait, pour certains de ces sels, de la solubilité de ces combinaisons, ne permettait d'ailleurs pas d'attendre beaucoup de ce procédé.

Nous avons également tenté en vain de tirer parti de la réaction suivante qui est peu connue et qu'a signalée del Arbre [9].

Les glycocholate, taurocholate et hyoglycocholate de sodium donnent avec les solutions de strychnine, brucine, quinine, quinchine, cinchonine, vératrine et émétine, des combinaisons le plus souvent très peu solubles dans l'eau et dont les formules ont été étudiées. A supposer même que l'élimination ultérieure de l'alcaloïde ne présente pas de difficulté, la réaction n'est pas utilisable ici, parce que les précipités formés au sein de la bile sont extrêmement impurs, et surtout parce que nous avons constaté que le précipité donné par le glycocholate de soude avec le chlorhydrate de quinine est redissous par un excès de ce dernier sel.

Nous avons enfin cherché à isoler les sels biliaires en les fixant par adsorption sur un précipité de sulfate de baryte ou de carbonate de zinc ou d'hydrate d'alumine; ces précipités n'ont pas entraîné la totalité des sels biliaires, tandis qu'ils entraînaient précisément les substances gênantes. Le noir animal nous a fourni également des résultats inutilisables; employé en grand excès, et en milieu aqueux, il fixe bien les sels biliaires, mais aussi en partie les composés azotés qui les accompagnent, et en outre les pigments; il faudrait aussi tenir compte des variations du pouvoir adsorbant que possèdent les différents échantillons de noir, et même de la pureté de ces échantillons dont certains sont souillés de composés ammoniacaux. De toute manière, ces méthodes d'isolement par adsorption exigeraient des purifications longues et aléatoires; il en est de même de la technique qui consisterait à précipiter les sels biliaires par le sulfate d'ammoniaque (Meillère [196]) avec cette circonstance aggravante que les sels ammoniacaux qui pourraient subsister troubleraient le dosage gazométrique.

2° *Elimination de l'urée, de l'ammoniaque et des amino-acides libres.* — Comme on l'a vu, c'est l'intervention de ces composés, et surtout des amino-acides libres, qui rend nécessaire le dosage de l'azote avant hydrolyse. Aucune réaction de précipitation ne permet de les éliminer simultanément, mais on peut remarquer que l'hypobromite de soude met en liberté l'azote

de l'urée, de l'ammoniaque et des acides aminés. Quant à son action sur les acides biliaires, elle n'a pas encore été étudiée. Si l'expérience montre que l'azote de ces derniers acides n'est pas libéré par l'hypobromite, il sera possible de faire disparaître, à l'aide de ce réactif, l'urée, l'ammoniaque et les amino-acides préexistants et, après hydrolyse alcaline, la méthode de van Slyke ne dosera plus que l'azote aminé appartenant aux sels biliaires. Nous avons donc cherché à apprécier l'action de l'hypobromite sur les sels biliaires à l'aide d'une méthode iodométrique, qui s'est montrée inapplicable, puis par gazométrie. N'ayant pas observé de libération de l'azote aminé et ayant obtenu des résultats satisfaisants par la méthode à l'acide nitreux, en traitant par l'hypobromite des mélanges de sels biliaires et d'autres composés azotés, nous avons pu apporter à la technique la simplification projetée. Ces essais ont été ainsi conduits.

A) *Etude de l'action de l'hypobromite sur les sels biliaires et sur l'acide cholalique*

1° PAR UNE MÉTHODE IODOMÉTRIQUE DIFFÉRENTIELLE

Nous avons tout d'abord pensé à calquer pour ainsi dire ces expériences sur le mode opératoire employé par Golse [113] pour le dosage iodométrique de l'urée, et par Pohorecka-Lelecz [228] pour celui de l'urée et de l'ammoniaque. Ces méthodes consistent à mettre en œuvre un excès d'hypobromite dont le brome « actif » (hypobromite + bromate) est dosé par iodométrie avant et après la réaction; la différence entre les deux titrages correspond à l'hypobromite utilisé pour la décomposition de l'urée ou de l'ammoniaque. Nous avons donc tenté de rechercher et d'apprécier ainsi l'action de l'hypobromite sur les sels biliaires.

Nous avons mis en contact pendant 15 minutes, avec 2 cm³ d'une solution d'hypobromite (1) préparée suivant la formule II de Philibert [223], le produit d'évaporation d'une solution alcoolique de glycocholate de soude, soit 74 mg. de ce sel; puis le mélange fut dilué et additionné de 10 cm³ d'une solution au cinquième d'iodure de potassium et d'un excès d'acide sulfurique. Le dosage de l'iode a consommé 3,6 cm³ d'hyposulfite N/10. Dans un essai témoin portant sur le même volume d'hypobromite, il a fallu 5 cm³ 4 d'hyposulfite. Il est donc dis-

(1) Solution âgée de plusieurs semaines.

paru une quantité de brome correspondant à 1 cm^3 8 d'hyposulfite. Cela n'est pas dû à une hydrolyse partielle de sel biliaire pendant l'évaporation alcoolique, avec production de glycocholate qu'attaquerait aussitôt l'hypobromite, car 0 g. 10 de sel dissous directement dans 5 cm^3 7 d'hypobromite récent, ont consommé également une partie du réactif (5 cm^3 7 et 8 cm^3 2 au bout d'un temps plus long, en hyposulfite N° 10). La présence d'impuretés dans le produit n'explique pas entièrement ces résultats, car avec 15 mg. d'acide glycocholique pur, la différence a été encore de 1 cm^3 .

On peut aussi se demander si, indépendamment de la copule aminée, le noyau cholalique de la molécule n'est pas lui-même oxydé par l'hypobromite. En fait, 0 g. 10 d'acide cholalique ont consommé une dose d'hypobromite correspondant à 7 cm^3 2 d'hyposulfite. Dans cet essai, et dans d'autres expériences semblables, il s'est formé, lors de l'acidification, un précipité brun volumineux que l'hyposulfite ne décolorait pas entièrement. Pour éviter que l'iode à doser ne puisse échapper au titrage en se fixant ainsi sur l'acide cholalique, il convenait d'éviter sa libération en répétant ces évaluations en milieu alcalin, comme l'a fait entre autres P. Fleury [92] pour l'étude de l'hypobromite. Par la méthode à l'acide arsénieux, en milieu bicarbonaté, on ne dose plus à la fois le bromate et l'hypobromite, mais seulement ce dernier composé. Alors que 2 cm^3 de la solution d'hypobromite employée consommaient 9 cm^3 4 d'acide arsénieux N° 10, on n'a plus utilisé, après avoir fait agir la même dose de réactif sur 0 g. 10 d'acide cholalique, que 0 cm^3 7 de solution titrée; avec 0 g. 05 d'acide cholalique, ce chiffre a été de 2 cm^3 4.

Les résultats obtenus précédemment en opérant sur le glycocholate peuvent n'être dus qu'à l'action de l'hypobromite sur la fraction cholalique de ce sel, ce qui suffit à empêcher toute étude, par ce procédé iodométrique, du comportement de la fraction aminée de la molécule. Cette action de l'hypobromite est sans doute complexe, car on ne constate pas de proportionnalité entre la dose de produit mise en œuvre et la quantité d'hypobromite disparue; peut-être doit-elle être rapprochée de la transformation de l'acide cholalique en acide biliobanque obtenue par Pringsheim [236] en faisant agir le brome sur l'acide cholalique en solution fortement alcaline. A propos du dosage colorimétrique des sels biliaires (p. 147), nous signalons une décomposition analogue de l'acide cholalique par l'hypochlorite et par l'eau oxygénée.

2° PAR GAZOMÉTRIE EN PRÉSENCE D'HYPBROMITE

Si l'on introduit dans un uréomètre une solution aqueuse de glycocholate de soude, puis de l'hypobromite, on n'observe pas le dégagement gazeux qui se produirait si le glyco-colle combiné était attaqué. Avec 0 g. 50 et 1 g. de ce sel, nous n'avons obtenu que des traces de gaz de l'ordre de 0cm³ 05, que l'on est en droit de considérer, de même que dans les dosages d'urée, comme de l'oxygène.

3° PAR GAZOMÉTRIE A L'AIDE DE LA RÉACTION DE VAN SLYKE

Cette réaction a été appliquée de la même manière que pour l'analyse de la bile. Le sel biliaire était dissous dans l'alcool. Nous avons évaporé, dans deux capsules A et B, des volumes égaux de cette solution. Le contenu de la capsule A fut repris par la soude à 8 ° et l'azote aminé dosé après chauffage à 100° pendant six heures. Le contenu de la capsule B fut délayé dans 2 cm³ d'hypobromite; après cinq minutes, l'excès d'hypobromite fut détruit par l'eau oxygénée et la solution additionnée de 8 ° de NaOH, puis chauffée comme A pour un second dosage de l'azote aminé. L'élimination par l'eau oxygénée de l'excès d'hypobromite a pour but d'empêcher que ce dernier ne décompose l'acide aminé au fur et à mesure de l'hydrolyse du sel biliaire, au cas où, du moins au début du chauffage, cette hydrolyse serait plus rapide que la destruction de l'hypobromite elle-même par la chaleur. En outre des dosages à blanc ne portant que sur les réactifs habituels, nous en avons effectué d'autres en ajoutant hypobromite et eau oxygénée. L'introduction de ces deux réactifs ne modifia pas la valeur de la correction obtenue en premier lieu et qui doit être soustraite de tous les dégagements gazeux observés.

Voici, exprimés en mg. d'azote aminé, les résultats de cinq expériences ainsi conduites :

		Capsule A	Capsule B
Taurocholate	I	1.51	1.50
	II	0.61	0.64
	III	2.11	2.00
Glycocholate	I	1.20	1.25
	II	3.29	3.37

Que le sel biliaire ait été ou non mis en présence d'hypobromite, il donne, après hydrolyse, sensiblement le même chiffre

d'azote; l'écart observé est du moins dans les limites d'exactitude de la méthode gazométrique.

B. — Dosage comparé des sels biliaires par la méthode différentielle et par la méthode en un temps.

Ce point étant établi, nous avons appliqué ces deux méthodes d'une part à des solutions de composition connue et d'autre part à des biles.

1° ANALYSE DE SOLUTIONS D'ACIDES BILIAIRES ADDITIONNÉS D'URÉE, D'AMMONIAQUE ET D'AMINO-ACIDES LIBRES

Solution I. — Cette solution est analogue au filtrat alcoolique au 1/5 d'une bile qui renfermerait par litre des doses très élevées de 2 g. d'urée, 1 g. de glyocolle libre et 0 g. 10 d'azote ammoniacal.

Cinq centimètres cubes de ce simili-filtrat contenaient donc 4 mg. 66 d'azote uréique, 0 mg. 93 d'azote aminé libre du glyocolle, 0 mg. 50 d'azote ammoniacal et en outre 2 mg. d'azote aminé combiné sous forme d'acide glycocholique. En raison de la forte proportion d'azote uréique, il a fallu employer ici 5 cm³ d'hypobromite pour qu'il ne se produise plus dans la capsule de dégagement gazeux perceptible.

a) En dosant l'azote aminé dans une première prise d'essai sans faire agir l'hypobromite et sans hydrolyser l'acide biliaire, on ne doit trouver que l'azote du glyocolle, accompagné d'une certaine portion de l'azote uréique et ammoniacal. Nous avons obtenu en fait 1 mg. 02, 1 mg. 05 et 1 mg. 07 (moyenne 1,05) au lieu de 0,93.

b) En dosant l'azote aminé dans une seconde prise d'essai, sans faire agir l'hypobromite, mais en hydrolysant l'acide biliaire au bain-marie, on doit obtenir, en plus du chiffre précédent, celui qui correspond à l'azote de l'acide glycocholique. Nous avons trouvé en fait 3 mg. 03, 3 mg. 10 et 2 mg. 98 (moyenne 3,03) au lieu de 2,93.

c) En dosant enfin l'azote dans une troisième prise d'essai, en faisant agir l'hypobromite et en hydrolysant l'acide biliaire, on ne doit plus retrouver que l'azote de ce dernier. Nous avons noté en fait 2 mg. 10, 2 mg. 12 et 2 mg. 12 (moyenne 2,11) au lieu de 2 mg. La méthode différentielle donne: $3,03 - 1,05 = 1,98$; la méthode en un temps donne 2,11 mg.

Solution II dont 5 cm³ renferment 140 mg. 85 de taurocholate de soude impur; nous avons ajouté ensuite 12 mg. 45 de taurine apportant 1 mg. 39 d'azote aminé.

En l'absence de taurine, la méthode différentielle a donné 2,46 — 0,34 = 2 mg. 12 et la méthode directe 2 mg. 15.

Après addition de taurine, la méthode différentielle a donné avant hydrolyse: 1 mg. 67 au lieu de 1,73, et après hydrolyse: 3,79 au lieu de 3,85; la différence est de 2,12, alors que la méthode directe donne 2,20.

Solution III dont 5 cm³ renferment 99 mg. 6 d'acide glycocholique apportant 3 mg. d'azote, et en outre 2 mg. 33 d'azote uréique, 0 mg. 93 d'azote du glycolle et 0 mg. 50 d'azote ammoniacal.

La méthode différentielle donne 4,20 — 1,06 = 3 mg. 14 au lieu de 3; la méthode en un temps donne 3 mg. 18.

2° ANALYSE DE BILES PAR LES DEUX MÉTHODES

Les résultats sont rassemblés dans ce tableau et exprimés en grammes d'azote par litre de bile. Dans les colonnes A et B figurent les valeurs obtenues avant et après hydrolyse à l'aide de la méthode en deux temps; en C, les chiffres trouvés par différence pour l'azote aminé des sels biliaires; en D les résultats fournis pour le même élément par la méthode en un temps. Les dosages portaient sur 5 cm³ de filtrat alcoolique au cinquième, le résidu d'évaporation (1 cm³ de bile) étant traité par 5 cm³ d'hypobromite pendant 5 minutes.

		A	B	C	D
Bœuf	V	0,11	1,21	1,10	1,08
Mouton	II	0,26	2,50	2,24	2,34-2,22
Porc	I	0,17	2,12	1,95	2,00
Mouton	III	0,45	1,93	1,49	1,52
Mélange de liquides duodén.		0,24	0,54	0,30	0,33-0,28
Bœuf	VI	0,10	2,34	2,24	2,33

Les deux techniques conduisent donc à des résultats très voisins, et nous pouvons décrire maintenant le nouveau mode opératoire. Ce dernier comporte évidemment deux dosages, lorsqu'on examine une seule bile ou lorsqu'on emploie les réactifs pour la première fois; il faut en effet connaître le volume du dégagement gazeux que donnent ces réactifs eux-mêmes, pour le

déduire par la suite de tous les volumes observés au cours des dosages. Mais cette correction étant ainsi déterminée une fois pour toutes, on n'aura qu'à en tenir compte dans chaque analyse ultérieure faite avec ces réactifs.

C. — *Technique de la méthode gazométrique en un temps*

Quoique cette technique ressemble, à bien des égards, à celle que nous avons indiquée page 72, nous l'exposerons intégralement, pour éviter de multiples renvois à la description antérieure.

1° RÉACTIFS NÉCESSAIRES

- A) Solution aqueuse de nitrite de soude à 40 %.
- B) Acide nitrique à 36° Baumé dilué au quart (en volumes).
- C) Solution aqueuse de soude (en plaques) à 16 %.
- D) Solution alcaline de permanganate de potasse, renfermant par litre 50 gr. de MnO^4K et 25 gr. de KOH.
- E) Alcool caprylique.
- F) Hypobromite de soude, obtenu avec: lessive de soude pure $d=1.33$, 17 cm^3 ; eau distillée q. s. pour 200 cm^3 ; brome 2 cm^3 5.
- G) Eau oxygénée à 30 % (100 volumes).

2° ESSAI DES RÉACTIFS

Mesurer, dans un tube à essais jaugé à 10 cm^3 , 5 cm^3 d'hypobromite; ajouter goutte à goutte de l'eau oxygénée jusqu'à ce que le contenu du tube soit incolore et qu'il ne se produise plus de dégagement d'oxygène; noter ce nombre de gouttes sur l'étiquette du flacon. Ajouter 5 cm^3 de solution de soude à 16 %. Chauffer le tube bouché au coton au bain-marie bouillant pendant 6 heures; refroidir et ramener à 10 cm^3 le volume du liquide. Prélever 5 cm^3 et les neutraliser, en présence de phtaléine, avec de l'acide nitrique dilué. En ajoutant quelques gouttes de solution de soude, donner au mélange une réaction légèrement alcaline. Le verser dans l'uréomètre, garni d'un petit agitateur, en lavant ensuite avec un peu d'eau bouillie le vase dans lequel on a fait la neutralisation. Ajouter 5 cm^3 de la solution de nitrite, puis une goutte d'alcool caprylique, et remplir l'appareil avec de l'eau bouillie de la même manière que pour un dosage d'urée, c'est-à-dire en comprimant le plus possible le capuchon de caoutchouc. Introduire par le robinet 2 cm^3 d'acide nitrique dilué et agiter

l'uréomètre pendant cinq minutes; le déboucher en plongeant le capuchon dans un grand verre à expérience rempli d'eau et laver plusieurs fois le gaz avec de l'eau bouillie en évitant toute rentrée d'air; faire arriver ensuite, par petites quantités, la solution de permanganate jusqu'à ce que le volume gazeux, qui diminue peu à peu, reste fixe. Laver le gaz avec de l'eau bouillie et transporter l'uréomètre dans une cuve pleine d'eau. Noter au bout d'un quart d'heure le volume gazeux en centimètres cubes.

Connaissant la température de l'eau de la cuve et la pression atmosphérique, on peut ramener ce volume à 0° et 760 mm. et calculer en milligrammes le poids d'azote qui lui correspondrait, en multipliant le volume corrigé par 1,25. Il est plus simple de se reporter au tableau établi pour les dosages différentiels (Appendice, p. 185), à la condition de multiplier les coefficients par 10.

Exemple: Dégagement 0 cm³ 4; T = 16 °C.; P.A. = 770 mm.

Le coefficient du tableau est 0,1172; multiplié par 10, il devient 1,172. La correction trouvée pour les réactifs, exprimée en milligrammes d'azote, est $p = 0,4 \times 1,172 = 0$ mg. 46. Noter cette valeur dont on tiendra compte tant que l'on utilisera les mêmes réactifs.

3° DOSAGE DES SELS BILIAIRES

A. — *Défécation de la bile.*

A 10 cm³ de bile ajouter peu à peu et en agitant 30 cm³ d'alcool à 95°, puis chauffer jusqu'à une température voisine de l'ébullition. Filtrer et laver à plusieurs reprises le précipité avec de l'alcool chaud. Laisser refroidir le filtrat et compléter avec de l'alcool son volume à 50 cm³.

B. — *Traitement par l'hypobromite et hydrolyse.*

Evaporer au bain-marie dans une petite capsule 10 cm³ de filtrat et délayer le résidu, avec un petit agitateur, dans 5 cm³ d'hypobromite; au bout de 5 minutes environ, ajouter le même nombre de gouttes d'eau oxygénée que lors du dosage à blanc. Verser le contenu de la capsule dans un tube à essais jusqu'à 10 cm³ et laver la capsule avec 5 cm³ de la solution de soude à 16 %. Boucher le tube avec un tampon de coton et le chauffer au bain-marie bouillant pendant six heures. Après refroidissement, ramener le volume à 10 cm³ avec de l'eau distillée.

C. — Dosage gazométrique de l'azote aminé.

Neutraliser 5 cm³ du liquide et effectuer ce dosage de la même manière que précédemment. Noter le volume gazeux observé, ainsi que la température et la pression atmosphérique.

D. — Calcul des résultats.

Chercher sur la table le coefficient délimité par les conditions de l'expérience et le multiplier par 10.

En multipliant ensuite le volume (en cm³) par ce nouveau coefficient, on a en milligrammes le poids P d'azote correspondant à ce volume.

Enfin $\frac{P - p}{2}$ = Azote (en grammes) des sels biliaires par litre de bile.

Exemple: Dégagement = 3 cm³; T = 20° C.; P. A. = 755 mm.

p (déjà connu) = 0 g. 46.

La table indique le coefficient 0,1127 qui devient ici 1,127.

P = 3 × 1.127 = 3.381, soit 3,38.

On a, en définitive, $\frac{3,38 - 0,46}{2}$ = 1 gr. 46 d'azote par litre.

OBSERVATIONS

Si le dégagement gazeux est trop abondant, on dispose du restant du liquide d'hydrolyse, et l'on peut recommencer le dosage sur 2 cm³ par exemple de ce liquide, soit sur 0 cm³ 4 de bile. La différence P — p est alors en milligrammes l'azote des sels biliaires de 0 cm³ 8 de bile (du fait de l'équation de van Slyke) et l'on termine le calcul en conséquence.

Inversement, si la bile est pauvre en sels biliaires, on évapora un volume double de filtrat (20 cm³) et l'on divisera le résultat par 2.

Dans le premier cas, il sera inutile de déterminer de nouveau p, quoique les quantités de bromure, de bromate et aussi d'eau oxygénée ne soient pas les mêmes que dans l'essai préalable des réactifs. Le dégagement gazeux produit dans cet essai ne provient pas de ces composés, mais des autres réactifs employés.

CHAPITRE IV

MÉTHODES UTILISANT L'HYDROLYSE
ALCALINE
(DOSAGE COLORIMÉTRIQUE)

Tout en conservant le principe essentiel de la méthode précédente, c'est-à-dire en dosant l'azote aminé avant et après l'hydrolyse alcaline des sels biliaires, on devait chercher, pour deux raisons, à effectuer ce dosage d'une autre manière. Il pouvait sembler tout d'abord avantageux de n'avoir pas à recourir à l'appareil de van Slyke; aussi Rosenthal et Lauterbach [246] ont-ils institué la méthode colorimétrique dont nous allons parler et qu'ils qualifient de « clinique ». Grâce à l'emploi d'uréomètres, nous n'estimions pas utile, au début de nos recherches, d'étudier un autre procédé plus commode que celui de van Slyke pour le dosage de l'azote aminé; nous y avons été cependant amené par une autre considération. Il est en effet intéressant de vérifier que, lorsqu'on met en œuvre la méthode gazométrique, on ne dose pratiquement que les amino-acides, ainsi que les expériences précédentes conduisent à le penser. Ce contrôle sera très démonstratif si l'on obtient les mêmes résultats en utilisant, pour les dosages, un procédé basé sur une réaction tout à fait différente de la réaction à l'acide nitreux. Pour réaliser ce « recouplement », nous avons donc réuni quelques données sur la technique de Rosenthal et Lauterbach. N'étant pas à même de l'appliquer, faute du réactif nécessaire, nous avons tenté de lui substituer un autre procédé, également colorimétrique. C'est à cette nouvelle variante de la méthode par hydrolyse que sera consacré ce chapitre.

I. — LA MÉTHODE DE ROSENTHAL ET LAUTERBACH [246]

Ces auteurs ont associé, à l'hydrolyse alcaline des sels biliaires selon Rosenthal et von Falkenhausen, le dosage de l'azote aminé selon O. Folin. Ce dernier a décrit en effet une technique de dosage des amino-acides aliphatiques, basée sur la production, en

présence du sel de sodium de l'acide β naphtoquinone-sulfonique, d'une coloration rouge [95]; cette réaction est analogue à celle qu'ont indiquée pour l'indol Herter et Foster [140], mais s'en distingue par ce fait que le dérivé de l'indol, qui est coloré en bleu, ne se forme qu'en milieu fortement alcalin, alors que la coloration fournie par les acides aminés se développe en milieu légèrement alcalin (pH env. 7,8). L'influence de l'alcalinité des solutions, qui doit être prise en considération, a été étudiée récemment par Edgar [86] et par Martens [193]. Nous décrirons intégralement la méthode de Rosenthal et Lauterbach, afin de montrer le travail qu'elle exige, et d'exposer par la même occasion la méthode de Folin.

Les réactifs nécessaires pour cette technique sont les suivants :

1° Solution étalon de glycocolle, dont 1 cm³ contient 0 mg. 07 d'azote aminé, et que l'on obtient extemporanément en diluant 100 cm³, avec de l'acide chlorhydrique N/10, 70 cm³ d'une solution mère renfermant 534 mg. 9 de glycocolle, 2 gr. de benzoate de soude et de l'acide chlorhydrique N/10 q.s.p. 1000 cm³;

2° Solution titrée de carbonate de soude, dont 8 cm³ 5 correspondent à 20 cm³ d'HCl N/10;

3° Solution de β -naphtoquinone-sulfonate de sodium à 0 gr. 10 pour 10 cm³, altérable très rapidement (en quelques heures);

4° Solution acétique d'acétate de soude, préparée en mélangeant des volumes égaux d'acide acétique à 50 % et d'une solution d'acétate de soude à 5 %;

5° Solution d'hyposulfite de soude à 4 %;

6° Solution alcoolique de phénolphthaleïne à 0,25 %.

Rosenthal et Lauterbach traitent ainsi les biles à analyser. A 40 cm³ de bile, ils ajoutent 3 volumes d'alcool à 96° et filtrent au bout d'une nuit; puis le précipité est lavé à l'alcool, les filtrats sont évaporés au bain-marie et le résidu est repris par l'alcool: après une nouvelle évaporation, le résidu est dissous dans de l'eau de façon à donner 10 cm³ de solution.

A 5 cm³ de cette solution (20 cm³ de bile), on ajoute 3 ou 4 gouttes d'HCl concentré et de l'eau q.s.p. 10 cm³, et enfin une cuillerée à thé de charbon médicinal de Merck. On agite pendant une minute et on filtre. 1 cm³ de cette solution incolore, que nous appellerons filtrat I, correspond maintenant à 2 cm³ de bile.

Les 5 cm³ restants de la solution précédente sont eux-mêmes additionnés de 5 cm³ de solution de soude à 16 ‰ et le mélange est chauffé au bain-marie bouillant pendant 5 heures. Après refroidissement, on l'introduit dans une fiole jaugée de 20 cm³ et on acidifie franchement avec 1 cm³ 5 à 1 cm³ 8 d'HCl concentré, puis on complète à 20 cm³ et on décolore par le charbon animal. 1 cm³ de filtrat (filtrat II) correspond à 1 cm³ de bile.

Les dosages colorimétriques sont alors conduits de cette manière:

1° Dans une fiole jaugée à 30 cm³, on mesure successivement 1 cm³ de solution étalon de glycolle, 3 cm³ d'eau distillée, une goutte de phénolphtaléine et 1 cm³ de solution de carbonate;

2° Dans une série d'autres fioles, on mesure des volumes différents, compris entre 5 et 10 cm³, du filtrat I (prises d'essais correspondantes à des volumes de bile non hydrolysée variant de 10 à 20 cm³), puis 1 goutte de phtaléine et q. s. de solution de carbonate jusqu'à ce que la teinte soit identique à celle de l'étalon.

3° Dans d'autres fioles jaugées, on mesure 0 cm³ 5, 1 cm³ et 2 cm³ de filtrat II (correspondant aux mêmes volumes de bile hydrolysée), puis 2 cm³ 5 d'eau dans la première fiole, 2 cm³ dans la seconde et 1 cm³ dans la troisième.

4° On ajoute ensuite, dans toutes les fioles, 5 cm³ d'eau distillée et 2 cm³ de réactif sulfonique de Folin, puis on laisse les colorations se développer pendant 19 heures au moins, à l'obscurité; on ajoute enfin 2 cm³ de solution acétique et 2 cm³ de solution d'hyposulfite et l'on complète à 30 cm³ avec de l'eau distillée.

5° Les colorations qui s'y prêtent sont alors comparées, sans attendre plus d'une heure, avec celle de l'étalon. Sachant que ce dernier contient 0 mg. 07 d'azote aminé et connaissant d'autre part les volumes de bile mis en expérience, on calcule le taux d'azote aminé libre (avant hydrolyse) et le taux d'azote aminé total (après hydrolyse). On a ainsi par différence, de même qu'avec la méthode gazométrique, celui de l'azote aminé appartenant aux sels biliaires.

6° Mais Rosenthal et Lauterbach ayant constaté que les deux tiers seulement de l'azote de la taurine entrent en réaction, et cela

même en présence d'un excès de β -naphtoquinone-sulfonate, on doit tenir compte de cette particularité pour faire le départ entre les glycocholates et les taurocholates. Le soufre étant dosé à l'état de SO_4Ba , on l'attribue à la taurine et on calcule l'azote qui lui correspond; en divisant la valeur trouvée par 1,5, on a la fraction de l'azote de la taurine qui a contribué à fournir la coloration observée. L'azote du glyocolle est donné par la soustraction: azote aminé des sels biliaires — azote de la taurine corrigé; on passe à l'acide glycocholique à l'aide du facteur 33,12. Le coefficient 36,69 permet d'exprimer en acide taurocholique l'azote de la taurine, connu lui-même grâce au dosage du soufre.

Les auteurs de cette méthode ont dû évidemment vérifier que les amino-acides n'étaient entraînés ni pendant la précipitation par l'acide chlorhydrique des acides biliaires de la bile non hydrolysée, ni pendant la précipitation par le même acide de l'acide cholalique de la bile hydrolysée, ni pendant la décoloration des solutions par le charbon animal.

N'ayant pas eu le loisir de préparer nous-même le réactif sulfonique, et n'ayant pu nous le procurer à l'étranger que moyennant un long délai de fabrication, nous n'avons pas utilisé cette méthode. La nécessité de nombreux essais pour l'analyse d'une seule bile et la lenteur de la réaction de Folin nous semblaient d'ailleurs la rendre assez peu pratique. Elle a été essayée par Aldrich et Bledsøe [7] au cours de leurs recherches sur le dosage des sels biliaires dans le sang à l'aide de la réaction de Pettenkofer (voir page 132). Pour préciser la valeur de leur propre méthode, ces auteurs l'ont en effet appliquée à l'analyse de la bile, en dosant également les sels biliaires par la méthode gazométrique de Foster et Hooper et par la méthode colorimétrique de Rosenthal et Lauterbach. Ils ont ainsi constaté que cette dernière fournissait sensiblement les mêmes chiffres que la précédente, mais qu'elle n'était pas utilisable pour l'examen de la bile de chien, riche en sels biliaires sulfurés. La réaction colorée donnée par la taurine est beaucoup moins régulière que ne le disent les auteurs allemands; la teinte produite n'est pas identique à celle que développent le glyocolle et l'alanine, et semble être influencée par la proportion dans laquelle figure la taurine par rapport aux autres amino-acides présents. Le coefficient de correction proposé par Rosenthal et Lauterbach ne serait ainsi, tout au plus, qu'approximatif.

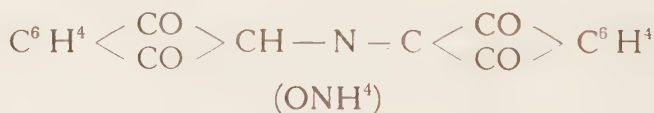
II. — EXPÉRIENCES PERSONNELLES SUR L'EMPLOI DE LA NINHYDRINE

1° La réaction à la ninhydrine et son utilisation pour le dosage de l'azote aminé

A l'occasion de recherches de chimie organique portant sur l'hydrate de tricétohydrindène $C^6H^4 \begin{smallmatrix} \text{CO} \\ \text{CO} \end{smallmatrix} > C \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{OH} \end{smallmatrix} \text{ (1)}$

Ruhemann [249] observa la production, avec les α -amino-acides, d'une coloration bleue. Les amino-acides en β , γ et δ réagissent beaucoup moins nettement, et les α -amino-acides substitués soit à la fonction aminée, soit au carboxyle, sont inactifs.

Après avoir, dans son premier travail, obtenu cette réaction colorée avec le glycocolle, l'alanine, la valine, la leucine, la tyrosine, les acides α -amino β -phénylpropionique, aspartique et glutamique, Ruhemann [251] l'a expliquée, dans le cas de l'alanine, par la formation du sel d'ammonium de la dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine :



Tandis que l'hydrate de tricétohydrindène devenait ensuite, sous le nom de *ninhydrine*, un produit commercial, cette réaction était vulgarisée par les nombreux travaux d'Abderhalden et de ses collaborateurs sur le diagnostic de la grossesse et du cancer, en ne conservant d'ailleurs qu'un caractère qualitatif (voir surtout sur ces travaux l'ouvrage d'ensemble d'Abderhalden [5]). Sa sensibilité a été étudiée à cette occasion par Abderhalden et Schmidt [4] qui ont pu déceler ainsi 1 p. de glycocolle dans 65.000 p. d'eau; l'histidine a même fourni une réaction positive à une dilution à 1 79.000. L'intervention de quelques substances à fonctions oxygénées a été envisagée par Halle, Lœwenstein et Pibram [125].

Quoique Abderhalden et Lampé [3], en étudiant l'absorption digestive, aient effectué des estimations grossières, la première

(1) Ce composé s'obtient (Ruhemann [250]) en traitant par SO^4H^2 le produit de condensation de la p-nitroso-diméthylaniline avec la β -hydrindone. Cette dernière résulte de l'action d' $AlCl^3$ sur le chlorure d'acide phénylpropionique. (Kipping [159]).

tentative réelle d'un emploi quantitatif est due à Herzfeld [141], qui déterminait au spectrophotomètre le coefficient d'extinction des solutions colorées. Mais le travail le plus intéressant pratiquement sur cette question est celui de Harding et MacLean [134].

En cherchant à substituer, aux mesures spectrophotométriques d'Herzfeld, des comparaisons colorimétriques, ces auteurs ont tout d'abord obtenu des résultats tout à fait erronés, en raison du comportement différent des divers acides aminés mis en œuvre. Ces résultats ont été ensuite améliorés grâce à l'emploi d'un grand excès de ninhydrine et surtout moyennant l'addition de pyridine, qui agit sans doute en bloquant les fonctions acides. Sauf en ce qui concerne la cystine, la réaction ainsi modifiée permet de doser des quantités d'azote aminé comprises entre 0 mg. 005 et 0 mg. 05, par centimètre cube de solution, avec une précision qui serait comparable à celle de la méthode de van Slyke. Harding et MacLean ont dosé, par les deux méthodes, l'azote aminé dans des peptones et ont ensuite appliqué leur technique à l'étude de l'hydrolyse pancréatique des protides [135].

Quoique ces auteurs aient observé que l'urée et l'ammoniaque troublaient la réaction, nous avons tenté d'utiliser cette dernière pour le dosage des sels biliaires.

2° Dosage du glyocolle et de la taurine

Aucun des auteurs précédents n'a fait porter ses essais sur la taurine, dont il était essentiel pour nous de connaître l'action sur la ninhydrine. Quoique Neuberg [210] ait montré que, malgré l'absence de carboxyle, cet amino-acide donnait une réaction positive, il n'était pas certain que cette réaction fût régulière et pût être assimilée à celle que fournit le glyocolle.

Ayant donc préparé des solutions de glyocolle et de taurine dont 1 cm³ renfermait 0 mg. 05 d'azote aminé, nous avons fait cet essai comparatif: à 1 cm³ de chaque solution ont été ajoutés 1 cm³ d'une dilution de pyridine à 10 % et 1 cm³ d'une solution aqueuse récente de ninhydrine à 1 %. Nous n'avons pu obtenir une solution à 2 % (titre indiqué par Harding et MacLean) de la ninhydrine Creil dont nous disposions, et qui ne se dissolvait pas entièrement (échantillon assez ancien). Les deux tubes étant chauffés au bain-marie bouillant, le mélange contenant le glyocolle s'est coloré aussitôt en bleu violet, tandis qu'avec la taurine la réaction ne s'est faite qu'au bout de 1 à 2 minutes. Après 20 minutes de chauffage, le contenu de cha-

que tube fut dilué à 50 cm⁴. Des deux solutions obtenues, bleues par transparence et violettes par réflexion, la solution correspondant au glyocolle était deux fois plus colorée que la solution renfermant la taurine. En l'absence de pyridine, le glyocolle ne développe — et moins rapidement — qu'une teinte plus pâle.

Nous avons répété cette expérience, mais avec une solution de ninhydrine à 2 % (ninhydrine Hoechst de Meister-Lucius). Dans ces conditions, le glyocolle et la taurine réagissent d'une manière identique, la coloration bleue apparaissant en même temps, et avec la même intensité, dans les deux tubes. Examinées au colorimètre, sous une même épaisseur, les solutions montrent des teintes semblables, quelle que soit l'épaisseur adoptée. Nous avons constaté en outre que les solutions colorées précédentes, et qui étaient âgées de 24 heures, étaient restées inaltérées, et que le glyocolle s'était comporté de la même façon lors des deux essais, quoique la dose de ninhydrine employée ait varié du simple au double.

Pourvu que soient respectées les indications de Harding et MacLean, l'azote de la taurine et l'azote du glyocolle sont donc également bien décelés par la réaction à la ninhydrine.

Des expériences quantitatives, faites dans les mêmes conditions, ont donné les résultats suivants, l'étalon étant constitué par une solution de glyocolle à 37 mg. 3 p. 100 cm³, dont 1 cm³ contenait 0 mg. 0562 d'azote. Les doses d'acides aminés employées étaient de même parfois supérieures à 0 mg. 05 (limite prise par les auteurs américains).

Amino-acide	Quantité introduite (mg.)	Azote calculé (mg.)	Azote trouvé (mg.)	Erreur %
Glyocolle...	0.402	0.075	0.076	+ 1.3
—	0.201	0.0375	0.038	+ 1.3
Taurine.....	0.502	0.0562	0.057	+ 1.4
—	0.600	0.075	0.073	— 2.6
—	0.334	0.0375	0.036	— 4.0

Avec des solutions pures de ces acides aminés, la méthode de Harding et MacLean fournit donc des chiffres satisfaisants. La coloration des solutions, éclairées à la lumière électrique, est celle d'une solution de permanganate et se prête bien aux comparaisons.

3° Dosage des sels biliaires dans la bile

Connaissant les résultats donnés par l'analyse gazométrique de quelques biles, nous avons dilué ces dernières de telle façon que 1 cm³ de dilution renferme environ 0 mg. 05 d'azote aminé. A

chaque bile correspondaient ainsi deux dilutions, de titre différent mais déterminé, dont l'une a servi au dosage de l'azote aminé préexistant et l'autre au dosage de l'azote aminé total après hydrolyse des sels biliaries. Ces dosages étaient faits comme il vient d'être dit, par comparaison avec une solution titrée de glycolle. Les résultats sont exprimés en grammes par litre:

Bile	Az. am. libre		Az. am. total		Az. am. des sels biliaries	
	Gazom.	Ninhydr.	Gazom.	Ninhydr.	Gazom.	Ninhydr.
Veau.....	0.317	0.166	1.557	1.450	1.240	1.284
Mouton.....	0.291	0.350	2.860	3.050	2.560	2.700
Porc.....	0.264	0.195	1.588	1.550	1.324	1.355
Chien.....	0.289	0.250	2.029	1.950	1.740	1.700
Sol. taurocholate impur	—	—	0.042	0.044	—	—

Les deux méthodes fournissent, pour l'azote des sels biliaries, des résultats sinon identiques, du moins peu éloignés l'un de l'autre. Mais on doit remarquer des écarts notables en ce qui concerne les deux azotes dosés concurremment par les deux méthodes et dont le rapprochement donne le chiffre final, et c'est parce que ces écarts s'annulent en partie que ce dernier chiffre paraît à peu près satisfaisant. Pour l'un des échantillons (Veau, avant hydrolyse) cet écart est considérable.

Peut-être faut-il incriminer les autres constituants de la bile et en particulier l'urée et l'ammoniaque, ou bien, en raison des fortes dilutions pratiquées, de faibles erreurs colorimétriques se sont-elles trouvées grandement multipliées. Quoiqu'il en soit, les chiffres obtenus par les deux méthodes sont du moins du même ordre, ce qui autorise à penser que les deux réactions mises à profit portent sur les mêmes substances. Ce point sera considéré de nouveau, dans le chapitre suivant, à l'aide d'une autre technique.

Nous n'avons pas tenté d'améliorer le procédé que nous venons de décrire, en précisant l'influence des causes d'erreurs soupçonnées. Alors même que celles-ci pourraient être éliminées, la méthode resterait peu pratique; elle exigerait en effet un réactif assez coûteux et surtout elle comporterait, comme la technique de Rosenthal et Lauterbach, plusieurs essais simultanément conduits sur des prises d'essais plus ou moins importantes, afin que l'on soit amené à doser des quantités d'azote voisines de 0 mg. 05; même en préparant plusieurs étalons et en élargissant les limites d'application de la méthode, on ne serait pas dispensé de tâtonnements fastidieux.

CHAPITRE V

MÉTHODE UTILISANT L'HYDROLYSE
ALCALINE(DOSAGE VOLUMÉTRIQUE
DES SELS BILIAIRES PAR FORMOL-TITRATION)

Au lieu de chercher ainsi, par analogie avec la méthode de Rosenthal et Lauterbach, à doser l'azote aminé à l'aide d'une réaction colorée, il est certainement préférable d'établir une méthode volumétrique. Les deux buts déjà indiqués seront plus sûrement atteints, c'est-à-dire que d'une part l'on pourra mieux s'assurer de la nature des composés dosés avant et après hydrolyse des sels biliaires et que, d'autre part, les mesures de volumes gazeux seront remplacées par des lectures sur une simple burette. Tandis que seront supprimés les lavages et la purification des gaz dégagés, les limites d'application de la méthode seront considérablement étendues, puisqu'on ne sera plus astreint à ne pas dépasser un certain taux d'azote aminé, fixé lui-même par la capacité des appareils volumétriques (des uréomètres dans notre première technique).

Après y avoir tout d'abord songé, nous avons renoncé à doser l'azote aminé par la méthode de Kober et Sugiura [160], qui est basée sur la production, à partir des α et β amino-acides et de l'hydrate de cuivre, de complexes cupriques titrés ensuite par iodométrie ; ces auteurs ont montré que la réaction ne s'applique pas à la taurine. Nous avons adopté la titration au formol de Sørensen.

On sait que, depuis les premières publications de Schiff [268], cette méthode a fait l'objet d'un grand nombre de travaux, dont les plus importants sont ceux de Sørensen [274] et de Henriques et Sørensen [138-139], et que l'on trouvera résumés dans la revue de Jessen-Hansen [156]. Elle a été vulgarisée en France par quelques auteurs qui se sont occupés de l'ammoniaque ou des amino-acides urinaires, et en particulier par Ronchèse [243], Mestrezat [199] et Philibert [223]. Les mémoires de ces derniers étant faciles à consulter, nous nous abstenons d'exposer le principe de cette méthode, devenue d'ailleurs classique, et

dont quelques points essentiels seront considérés plus loin. Si elle semble être la seule qui permette de doser commodément, par volumétrie, l'azote aminé, elle ne possède peut-être pas une rigoureuse exactitude. Nous avons trouvé cette opinion exprimée dans quelques travaux non cités par les auteurs précédents, tels que ceux de Levene et van Slyke [178], Hardin et Mac Lean [135], Löb [184], Cook [65], Potter et Snyder [231], d'où il résulte que la formol-titration est moins précise que la méthode de van Slyke. Elle fournit du moins des résultats très voisins et peut être appliquée, à notre avis, au dosage des sels biliaires, car ce dosage lui-même, dans l'état actuel de nos connaissances sur la nature de ces sels et sur la constitution de la bile, ne saurait encore prétendre à une parfaite rigueur.

Avant de la faire servir à cette détermination, nous avons dû nous assurer que la formol-titration permettait de doser les faibles quantités d'azote aminé que nous pouvions rencontrer.

1. *Dosage, par la méthode au formol, de petites quantités d'azote aminé.*

Dans de premiers essais analogues à ceux de Mestrezat [199], mais portant sur des quantités telles d'acide aminé que l'on utilisât seulement quelques centimètres cubes de solution alcaline N/20, nous avons tout d'abord observé que le virage progressif de la phtaléine, du rose pâle au rouge foncé du témoin, était parfois assez difficile à saisir; nous avons donc tenté de remplacer cet indicateur par le bleu de bromo-thymol, dans l'espoir qu'un changement de coloration, du vert au bleu, serait plus net que l'intensification d'une teinte rouge. Cette substitution nous a amené à faire une série d'expériences, pour la raison suivante: lorsqu'on pratique la formol-titration de la manière courante, on amène la solution analysée à un pH voisin de 8 (teinte rose pâle de la phénol-phtaléine) et, après addition de formol, on fait arriver la solution alcaline jusqu'à ce que le mélange soit coloré en rouge foncé (pH un peu supérieur à 9, indiqué par un témoin).

C'est ainsi du moins que procèdent, entre autres, Mestrezat et Philibert, le premier de ces auteurs ayant montré [199] que, dans le titrage, on ne doit pas s'arrêter au rose pâle, comme le fait Ronchèse, et qu'il faut atteindre le rouge foncé, comme l'a prescrit Sørensen. Encore devrait-on, selon Henriques et Sørensen [139], partir d'un point très voisin de la neutralité (pH 6.8), qui correspond à une réaction très faiblement acide au « Lackmus-

Papier ». Donc, avec le Lackmus et la phtaléine, la formol-titration se fait entre pH 6,8 et pH 9 environ et, avec la phtaléine seule, entre pH 8 et pH 9. Il n'en sera pas de même avec le bleu de bromothymol, dont le premier virage, du jaune au vert, se situe vers pH 7 et qui prend une teinte bleu foncé à pH 7,6. Nous avons donc comparé les résultats obtenus avec l'un et l'autre de ces deux indicateurs. Cette partie de notre travail, ne concernant pas le dosage des sels biliaires, mais la formol-titration du glyocolle et de la taurine, figure à la fin de ce mémoire (Appendice II, p. 188). Nous l'y avons reporté pour ne pas introduire dans notre exposé une trop large parenthèse.

II. Dosage, par formol-titration, des sels biliaires dans la bile (Méthode différentielle)

Il semble donc que l'on puisse substituer la formol-titration à la méthode gazométrique pour doser dans la bile l'azote aminé, avant et après hydrolyse des sels biliaires. La nécessité d'un témoin coloré en rouge ou en bleu foncé ne constitue pas une complication puisqu'un même témoin conviendra pour toute une série de dosages. Si l'on néglige de doser séparément l'azote aminé préexistant, ce témoin supplémentaire pourra lui-même être supprimé. On aura, en effet, pour chaque analyse de bile, deux solutions à examiner. La première, contenue par exemple dans une fiole A, sera une dilution de bile non chauffée, et la seconde, contenue dans une fiole B, sera une dilution de bile dont les sels biliaires auront été hydrolysés. Les deux liquides seront amenés à une teinte rose pâle si l'on emploie la phénolphthaléine, et le formol sera ajouté dans chaque fiole. Puis on fera arriver la solution titrée dans la fiole A jusqu'à production d'une teinte franchement rouge. Du volume V de solution alcaline ainsi versée, une certaine fraction v neutralisera l'acidité due aux acides aminés libres, et l'excès E communiquera au mélange la coloration rouge franc. Pour donner la même coloration au contenu de la fiole B, il faudra y ajouter un volume V' de solution alcaline, lequel comprendra ici encore v , quantité qui correspond aux amino-acides libres également présents dans la bile puisqu'ils s'y trouvaient avant l'hydrolyse, plus un volume v' consommé par les amino-acides provenant des sels biliaires, et enfin l'excès d'alcali E nécessaire pour le virage du colorant au rouge foncé. On aura donc $v' = V' - V$, la fiole A servant de témoin pour le dosage proprement dit, pratiqué dans la fiole B.

En cherchant à examiner ainsi quelques biles, nous avons rencontré de multiples difficultés; nous ne les avons éliminées qu'au prix de nombreux essais, que nous ne ferons le plus souvent que résumer.

1° INTERVENTION DE QUELQUES SELS, DES ACIDES BILIAIRES ET DES PIGMENTS

La formol-titration ne peut être pratiquée en présence de carbonates et de phosphates; or, ces sels se trouvent dans la bile, en quantités très variables d'après les analyses, le plus souvent anciennes, qui les mentionnent (voir Dastre [75]). La plus récente détermination de CO^2 que nous connaissions est celle qui figure dans un mémoire de Nicloux [213] sur une méthode générale de dosage de l'acide carbonique; une bile de bœuf ainsi analysée renfermait 53 % de CO^2 ; il se formera en outre du carbonate de soude pendant l'hydrolyse alcaline des sels biliaires. Les carbonates et les phosphates seront donc éliminés par précipitation à l'aide du chlorure de baryum, de même que pour le dosage des acides aminés dans l'urine. Nous avons vérifié qu'en milieu neutre ou légèrement alcalin, cette élimination était complète et à peu près instantanée, qu'elle ne provoquait pas un entraînement des amino-acides, et que l'excès de chlorure de baryum subsistant dans les filtrats ne troublait pas la formol-titration. Appliqué à la bile, ce traitement lui enlève une partie des pigments, mais les filtrats restent fortement colorés. Lorsque le précipité formé est peu abondant, ce qui s'observe avec les biles non chauffées, il prend souvent un caractère colloïdal et traverse tous les filtres; on doit alors ajouter un peu de phosphate de soude pour obtenir un précipité plus dense et plus volumineux.

Lorsqu'on neutralise, avec de l'acide chlorhydrique par exemple, l'alcalinité des solutions à titrer, il se forme, et surtout dans le cas des liquides d'hydrolyse, un précipité blanc d'acides biliaires, d'acides gras, et, dans le dernier cas, de dérivés insolubles de l'acide cholalique, que les auteurs allemands appellent « dyslysine-artige ». Ces précipités ont tendance à s'agglomérer en grumeaux difficiles à diviser et à redissoudre, et qui empêchent souvent de neutraliser exactement les solutions, ce qui est un point essentiel. Si la prise d'essai renferme beaucoup de sels biliaires, l'acidité produite, au cours du titrage, par l'addition de formol, fait apparaître un précipité blanc de même nature, qui parfois ne se redissout pas à la fin de l'opération, et peut rendre impossible la comparaison des teintes. Nous avons pensé qu'en effectuant les dosages

en présence d'un volume suffisant d'alcool ou d'acétone, qui dissolvent ces précipités, nous éviterions cet inconvénient, mais les résultats sont devenus tout à fait mauvais et irréguliers. Il en fut d'ailleurs de même en opérant sur de simples solutions aqueuses de glyocolle ou de taurine, auxquelles l'addition d'alcool ou d'acétone communiquait une acidité très marquée, qui faussait complètement nos dosages. Nous avons trouvé l'explication de ce phénomène dans les travaux de Foreman [96], de Wilstaetter et Waldschmidt-Leitz [323] et de Harris [136], d'où il résulte que l'on peut doser, par alcalimétrie, les carboxyles des amino-acides (et même les groupements aminés, moyennant un titrage en retour), pourvu que l'on donne au milieu une teneur assez forte en alcool ou en acétone. Sur le mode d'action de ces derniers, on pourra consulter l'article publié par Wilstaetter [324], dans le traité d'Alberhalden, et surtout les travaux de Harris et le mémoire plus récent de Martens [192]; cet auteur a étudié ces méthodes et les considère comme plus exactes que celle de Sørensen. Nous n'avons pas tiré parti de ces recherches pour nos dosages, à cause de la dilution qu'il faudrait faire subir à nos solutions déjà pauvres en amino-acides; elles nous ont du moins apporté l'explication des anomalies signalées plus haut. La façon la plus simple d'éliminer ces acides gênants consiste à acidifier franchement les liquides à analyser et à séparer les précipités par filtration avant de procéder à la formol-titration.

Quant aux pigments biliaires, leur élimination sera le plus aisément obtenue à l'aide du noir animal, car il semble assez peu pratique de les fixer sur un précipité de chlorure d'argent ou de sulfure métallique, comme le font Sørensen et Jessen-Hansen [275] ou Abderhalden [1] pour l'analyse des liquides d'hydrolyse des protéines. Ce n'est pas toutefois que nous nous dissimulions le risque de perte auquel on s'expose de cette manière, car nous avons observé, avec des solutions de glyocolle, traitées par le noir animal, un déficit allant de 5 à 8 % (1). Nous avons cependant dû recourir à ce mode opératoire pour ces premiers essais, quitte à le supprimer plus tard.

A la suite de ces observations, nous avons donc établi une première technique dans laquelle deux volumes identiques de titrat alcoolique de bile étaient évaporés, puis les résidus étaient redissous dans la soude à 8 %. Après que l'une de ces solutions

(1) Cette observation contredit celles de Rosenthal et Lauterbach d'après lesquelles (p. 89) la décoloration des solutions par le charbon médicinal de Merck ne provoque pas de perte en azote aminé.

avait été chauffée au bain-marie, pendant six heures, elles étaient toutes deux acidifiées franchement par l'acide chlorhydrique, puis filtrées. Les filtrats étaient neutralisés et additionnés de chlorure de baryum et de noir animal. Les deux nouveaux filtrats obtenus, limpides et incolores, servaient à la formol-titration, conduite comme il a été dit page 96.

Si cette façon de procéder fournissait des résultats à peu près satisfaisants lorsqu'elle était appliquée à des solutions d'amino-acides et de sels biliaires, il n'en était pas toujours de même dans le cas des biles, analysées à la fois par cette méthode et par la méthode gazométrique. Les écarts observés nous ont conduit à envisager une autre cause d'erreur, que nous avons eu beaucoup de peine à faire disparaître.

2° ELIMINATION DE L'AMMONIAQUE

Quoique nous n'ayons pas trouvé de renseignements sur la présence de sels ammoniacaux dans les biles animales, ces sels peuvent s'y rencontrer, ou du moins y apparaître, sous une influence quelconque, avant l'analyse. Certains de nos filtrats alcooliques donnaient en effet très nettement la réaction de Nessler. D'autre part, Auguste [11] a dosé, dans des liquides duodénaux d'urémiques, de 0 g. 025 à 0 g. 128 d'azote ammoniacal par litre. Cet azote est beaucoup plus gênant ici qu'avec la méthode gazométrique, car la formol-titration le dose intégralement, alors que l'acide nitreux ne le libère qu'en partie (p. 68). Si un liquide duodénal en renferme 0 gr. 10 par litre, et si les dosages portent sur 10 cm³ de ce liquide, on utilisera de ce fait un excès de solution de baryte N/10 de près de 1 cm³. Le résultat final en sera d'autant plus faussé que cette cause d'erreur se sera entièrement manifestée au cours du dosage de l'azote aminé préexistant. Cette faible dose d'ammoniaque sera déplacée par la soude pendant l'hydrolyse des sels biliaires, mais il pourra en subsister dans la solution une certaine quantité provenant de la décomposition de l'urée (p. 67). On devra donc avant toute chose éliminer cette ammoniaque; le même problème s'est présenté à divers auteurs, et en particulier à Philibert [223]. Plusieurs techniques ont déjà été envisagées par ce dernier.

Après avoir rappelé ces techniques et mentionné les résultats que nous a donnés le mode opératoire adopté par Philibert, nous décrirons nos essais d'élimination de l'ammoniaque par la permutite et surtout à l'aide du réactif de Nessler avec précipitation ultérieure de l'excès d'iodomercurate au moyen de l'antipyrine.

a) *Le déplacement de l'ammoniaque par un alcali* (magnésie ou carbonate de lithine), suivi ou non d'un entraînement par un courant d'air, constitue une opération assez longue, et exige un appareil spécial. En l'effectuant dans un milieu complexe et mal connu, on peut craindre que quelque constituant intéressant de ce dernier ne subisse une décomposition partielle, et il faudrait s'assurer que les sels biliaires restent parfaitement inattaqués.

b) *La précipitation par l'acide phosphotungstique* a donné lieu à de nombreuses discussions, d'où il semble résulter que, si elle élimine l'ammoniaque, c'est au prix d'une surveillance étroite des réactifs, et en un temps souvent très long.

c) *La précipitation par les sels mercuriques* est basée sur cette observation de M. François [100] que, si l'on agite avec un excès d'oxyde de mercure une solution ammoniacale additionnée de soude et de carbonate de soude, l'ammoniaque est entièrement fixée à l'état d'oxyde ammonio-mercurique. Sur cette réaction est fondée la méthode d'élimination de Malfatti [189] dans laquelle l'oxyde de mercure est formé au sein du liquide examiné. Ayant constaté que cette technique était défectueuse, Philibert a cherché, mais sans succès, à l'améliorer.

d) *La précipitation à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien* lui a fourni par contre la solution du problème. Cette méthode, déjà proposée par Bournigault et Bith [42] consiste à ajouter à l'urine une solution de phosphate monocalcique, puis de la magnésie jusqu'à obtention d'une réaction alcaline à la phtaléine; après un contact d'une heure, le filtrat serait exempt d'ammoniaque. Philibert fut amené à préciser les conditions nécessaires pour une précipitation intégrale et à constater en particulier que si l'alcalinité est trop forte, l'ammoniaque n'est pas entièrement éliminée; en opérant dans un mortier et en filtrant rapidement à la trompe, il a pu obtenir des filtrats ne renfermant par litre que quelques centigrammes d'ammoniaque (1).

(1) Le même auteur a décrit en outre un procédé dit « par neutralisation automatique », permettant d'échapper aux incertitudes de la neutralisation, mais présentant, entre autres inconvénients, celui de laisser dans la solution une quantité notable d'acide phosphorique. Les amino-acides n'étant nullement retenus par le précipité, il suffit d'introduire finalement dans les calculs une correction empirique (afin de tenir compte des traces d'ammoniaque non éliminées) pour pouvoir doser les acides aminés dans les filtrats avec une approximation pratiquement suffisante (à 10 mg. près par litre d'urine). Cette élégante méthode permet de doser d'autre part l'ammoniaque dans le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien.

Ayant eu plusieurs fois l'occasion d'employer ce procédé pour l'analyse de l'urine, nous avons tenté de l'appliquer à l'analyse de la bile, avant et après hydrolyse des sels biliaires. Nous avons donc préparé trois solutions renfermant des quantités connues de glycocolle, d'acide glycocholique, d'ammoniaque et d'urée: une fraction de chacune d'elles fut chauffée au bain-marie pendant six heures, après addition de 8 % de NaOH, puis le mélange fut neutralisé par HCl et traité selon Philibert avant d'y doser l'azote aminé. Un dosage témoin, comportant ce même traitement, portait sur une fraction identique non chauffée. Les volumes de filtrats étaient choisis de telle sorte que les formol-titrations consommant de 5 à 10 cm³ de baryte N/20.

Voici les résultats trouvés, exprimés en grammes par litre de solution primitive :

	Glycocolle	Azote corresp ^t	Ac. glyco- cholique	Ammo- niaque	Urée	Az aminé libre trouvé	Az. aminé total trouvé	Az.am.de l'ac. bil. trouvé	Ac. glyco- cholique trouvé
I	0.800	0.149	5.00	0.25	0.30	0.142	0.299	0.157	5.21
II	1.00	0.186	7.50	0.50	0.50	0.180	0.305	0.215	7.14
III	1.50	0.280	10.00	1.00	1.00	0.285	0.575	0.290	9.63

Sans être tout à fait exacts, ces résultats permettaient d'estimer une estimation assez approchée des sels biliaires. Les écarts s'expliquent sans doute en partie par ce fait que, dans de tels dosages par différence, les deux déterminations doivent être également correctes, c'est-à-dire que les possibilités d'erreur sont deux fois plus nombreuses que dans le dosage direct des acides aminés urinaires. Or le temps délicat de l'opération est la neutralisation des mélanges par la magnésie; comme l'a bien souligné Philibert, il faut écraser très soigneusement les grains de magnésie et filtrer à la trompe le plus rapidement possible dès l'apparition de la moindre teinte rose. Ces précautions, en elles-mêmes fort simples, rendent vite pénible l'examen simultané de plusieurs biles, pour chacune desquelles elles doivent être prises deux fois. Aussi sera-t-il avantageux de pouvoir éliminer l'ammoniaque, et en même temps les pigments, à l'aide d'un réactif employé en quantité invariable.

e) *Elimination de l'ammoniaque par la permutite.* — Folin et Bell [94], puis Younburg [340] ont tiré parti, pour le dosage de l'ammoniaque et de l'urée urinaires, de la réaction donnée par les sels ammoniacaux avec la permutite, zéolithe alumino-

sodique ou potassique de R. Gans [108], dont la formule est voisine de celle-ci: 2 Si O^2 , Al^2O^3 , M^2O , $6 \text{ H}^2\text{O}$. Il s'effectue une substitution ionique suivant l'équation :

$\text{NH}^1\text{Cl} + \text{permutite Na} \rightleftharpoons \text{permutite NH}^1 + \text{NaCl}$,
et dont l'étude physico-chimique a été faite en particulier par Ramann et Sprengel [237], Ramann, Murz, Bierenberger et Sprengel [238], Schultze [272], Rothmund et Kornfeld [248]. Les auteurs américains fixent l'ammoniaque par la permutite, la déplacent par la soude et la dosent enfin par nesslerisation. Whitehorn [302] a montré plus récemment que de nombreuses bases azotées se comportent comme l'ammoniaque et se laissent libérer ensuite par le chlorure de potassium en solution saturée; ces propriétés ont été utilisées pour le dosage de l'adrénaline. Pohorecka-Lelec [229] a employé le même réactif pour séparer l'ammoniaque et l'urée, avant leur microdosage par « iodométrie hypobromique ».

La permutite dont nous disposions venait de Philipps et Pain. Elle fut réduite en une poudre pas trop fine, traitée par l'acide acétique dilué, lavée à plusieurs reprises par décantation et finalement séchée à l'air (1).

Nous résumerons ainsi les constatations faites en cherchant à éliminer l'ammoniaque dans des conditions analogues à celles que suppose le dosage des sels biliaires.

1° La fixation de l'ammoniaque se fait également bien lorsqu'à la permutite on associe le noir animal pour éliminer en outre les pigments.

2° Non seulement la soude, mais aussi le chlorure de baryum empêche l'élimination de l'ammoniaque. Cette observation se rapproche de celle de Folin, qui dilue l'urine pour atténuer l'influence des sels minéraux, et de celle de Whitehorn, qui déplace par le chlorure de potassium les bases combinées à la permutite.

3° En présence d'alcool (titre du mélange 80°), la réaction s'effectue comme en milieu aqueux.

(1) Ce traitement est rendu nécessaire par la réaction alcaline du produit; selon Folin, la dessiccation à 100° diminue le pouvoir absorbant pour l'ammoniaque. En agitant pendant 5 minutes, avec 5 grammes de cette permutite 30 cm^3 d'une solution renfermant 1 mg. d'azote ammoniacal, nous avons obtenu un filtrat ne donnant plus la réaction de Nessler.

4° Le traitement des biles pourrait donc comporter cette suite d'opérations: élimination des mucines et de l'ammoniaque par l'alcool et la permutite; précipitation des carbonates par le chlorure de baryum et décoloration par le noir. Quant aux biles ayant subi l'hydrolyse alcaline, il sera sans doute difficile de les débarrasser des traces d'ammoniaque qu'elles pourront contenir, car elles possèdent une forte teneur en soude et partant, après neutralisation, en chlorure de sodium.

5° De toute manière, la permutite ne sera utilisable que si elle ne fixe pas les amino-acides. Pour élucider ce point, nous avons ajouté 5 grammes de permutite à 50 cm³ d'une solution de glyco-colle à 1 gr. 075 par litre. Alors que la formol-titration, pratiquée sur la solution non traitée, y faisait trouver 1 gr. 06 de glyco-colle, elle n'en décelait, dans le filtrat, que 0 gr. 56, ce qui correspond à une perte de 65,2 %. Avec la même solution diluée au demi, puis au quart, ce déficit fut de 61,5 % et de 68 %. Il est très vraisemblable que d'autres échantillons de permutite se fussent comportés différemment, mais ces observations nous ont obligé à rejeter ce réactif, pour éviter des mécomptes.

f) Elimination de l'ammoniaque à l'aide du réactif de Nessler.

Il suffit d'avoir fait quelques dosages colorimétriques d'ammoniaque par nesslerisation pour avoir constaté qu'au lieu de la coloration jaune attendue, il se forme parfois un précipité rouge brique. Ce dernier apparaît lorsque la dose d'ammoniaque présente est trop forte, ou lorsque la solution examinée est trop riche en sels minéraux. Nous nous sommes demandé si cette observation courante ne pourrait pas servir de base à une méthode d'élimination de l'ammoniaque.

1° *La nature des composés formés dans la réaction de Nessler* n'offre ici qu'un intérêt secondaire, puisque l'essentiel est de rechercher si, dans certaines conditions, elle permet de précipiter toute l'ammoniaque que renferme une solution. Encore convient-il de l'envisager brièvement.

Depuis le travail initial de Nessler, la plupart des auteurs qui sont amenés à citer cette réaction admettent qu'il se forme l'iodure de dimercurammonium $Az\ Hg^2I$. C'est ainsi que, pour nous borner aux travaux récents, Boivin [28] ne mentionne que ce composé, tandis que Weber et Krane [300] isolent, pour doser

l'ammoniaque urinaire, l'iodure d'oxydimercurammonium $O < \begin{smallmatrix} \text{Hg} \\ \text{Hg} \end{smallmatrix} > \text{NH}^2 \text{I}$; la composition qui correspond à cette formule est d'ailleurs celle du corps décrit par Nessler: $\text{Az Hg}^2 \text{I H}^2 \text{O}$. Par contre, M. François [99] a montré que la réaction de Nessler ne fournissait pas que ce seul composé et qu'elle donnait également $\text{Hg}^9 \text{Az}^4 \text{I}^6$, qu'il a d'ailleurs obtenu par d'autres méthodes. Alors que le composé de Nessler se forme dans les solutions riches en ammoniaque, c'est le corps $\text{Hg}^9 \text{Az}^4 \text{I}^6$ qui prend naissance dans le cas des solutions étendues. Avec Buisson [45], M. François a fait voir que, si la réaction classique de Nessler est réversible, la réaction qu'il a décrite l'est également :



et que, par conséquent, lors du dosage de l'ammoniaque dans les eaux, une partie de l'ammoniaque n'est pas décelée; on obtient alors un nouveau précipité en ajoutant du réactif ou simplement de la potasse. Alors que, semble-t-il, la plupart des auteurs ne font pas état de ces constatations, c'est la formule de François que Golse, dans un travail sur la caractérisation de l'oxycyanure de mercure [114], attribue au précipité brun donné avec l'ammoniaque par les iodomercurates alcalins.

Parmi les nombreuses formules publiées pour le réactif de Nessler, nous avons adopté celle que Grigaut et Thiéry [119] ont indiquée pour le dosage de l'azote non protéique du sang et qui figure dans plusieurs manuels classiques; le réactif peut ainsi servir à d'autres usages que celui que nous en faisons dans le cas présent. Il renferme, par litre, 12 gr. d'iodure de potassium, 15 gr. de biiodure de mercure et 180 cm³ de lessive de soude à 36° Baumé.

2° *Observations préliminaires.* — a) Lorsqu'on ajoute un excès suffisant de réactif à une solution de chlorhydrate d'ammoniaque, il se forme le précipité habituel que surmonte un liquide coloré en jaune; ce dernier traverse les filtres sans se décolorer et le filtrat contient par conséquent de l'ammoniaque.

b) Si l'on additionne ce liquide de son volume d'une solution saturée de chlorure de sodium, le dérivé coloré flocule aussitôt, et on obtient un filtrat incolore, qui est parfaitement exempt

d'ammoniaque, car il ne donne plus la réaction de Nessler, ni celle de Berthelot-Lex (1).

c) Il s'est donc effectué une élimination intégrale de l'ammoniaque, dont on devra préciser les conditions. Mais cette réaction ne pourra être utilisée que si l'excès d'iodomercurate ne trouble pas le virage des indicateurs pendant la formol-titration; auquel cas il devra être lui-même éliminé, sans perte d'acides aminés, à l'aide d'un réactif n'exerçant pas davantage d'influence sur le dosage ultérieur.

3° *Action du réactif de Nessler sur le virage des indicateurs.* — Ayant ajouté 5 cm³ de réactif, préalablement neutralisé, à des volumes variables d'HCl N/10, nous n'avons pas constaté de perturbation en titrant ensuite l'acidité avec la soude ou la baryte N/10, en présence de phénol-phtaléine ou de bleu de bromothymol. Il s'est fait tout au plus, dans quelques essais, un très léger dépôt rougeâtre paraissant formé d'iodure mercurique.

4° *Action du réactif de Nessler sur la formol-titration.* — En opérant sur des solutions environ N/10 et N/20 de glycocolle, additionnées de 5 cm³ de réactif, nous avons eu quelque peine à saisir les virages. Lorsque le milieu est rendu alcalin, ainsi que l'exige la formol-titration, il apparaît un trouble gênant, puis un dépôt verdâtre sur les parois de la fiole; cet enduit a l'aspect de l'iodure mercurieux. On sait d'ailleurs qu'en milieu alcalin, le formol réduit très rapidement les iodomercurates, propriété mise à profit pour le dosage du mercure. Les filtrats doivent donc être débarrassés de l'excès d'iodomercurate.

5° *Élimination de l'iodomercurate par l'antipyrine.* — La méthode la plus simple consiste à engager l'iodomercurate dans une combinaison insoluble telle que les iodomercurates d'alcaloïdes. Entre toutes les bases azotées susceptibles de fournir de tels composés, nous avons choisi l'antipyrine, comme étant l'une des plus usuelles et des moins coûteuses. Si l'on ajoute peu à peu au réactif de Nessler une solution aqueuse d'antipyrine, on observe la production d'un précipité blanc jaunâtre qui se redissout ensuite; en neutralisant progressivement l'alcali, en présence de phtaléine, avec de l'acide chlorhydrique, on voit réapparaître le précipité. Lorsque le mélange est neutre, il possède un aspect

(1) On trouvera des indications sur cette réaction dans un travail antérieur [71].

laiteux et le précipité traverse les filtres, puis un excès d'acide le fait s'agglomérer en grumeaux et le filtrat est alors limpide. Il ne renferme plus trace de mercure. L'excès d'iodomercurate pourra donc être ainsi éliminé, pourvu toutefois que l'antipyrine ne trouble pas elle-même la formol-titration.

6° *Influence de l'antipyrine sur la formol-titration.* — Des solutions de glycocolle ont été additionnées d'une forte dose d'antipyrine (1 gr.); nous y avons retrouvé, par le méthode au formol, 39 mg. 8 d'acide-amino au lieu de 41,3, 15 mg. 1 au lieu de 15 mg. 5 et 8 mg. 4 au lieu de 8 mg. 7. Ces écarts sont du même ordre que ceux que l'on observerait en l'absence d'antipyrine. Avec une telle quantité de cette dernière, la phénol-phthaléine donne un trouble blanchâtre qui disparaît par addition d'eau ou de formol; avec le bleu de bromothymol, les solutions restent limpides.

7° *Détermination des quantités de réactifs nécessaires:*

a) En supposant que la bile renferme 0 gr. 20 d'azote ammoniacal par litre, teneur très élevée qu'on ne rencontrera sans doute pas, on peut calculer qu'une prise d'essai de 10 cm³ contiendra 2 mg. de cet azote; c'est cette dose que nous avons cherché à éliminer.

La réaction utilisée étant réversible, on ne saurait déterminer, *a priori*, en tenant compte de l'équation qui la traduit, la quantité d'iodomercurate qui précipitera 2 mg. d'azote; l'iodomercurate devra être employé en excès, de même que la soude, afin que la réaction se fasse dans le sens voulu; et puisque la formule du réactif est déjà fixée, c'est par l'expérience que le volume nécessaire doit être précisé.

A 20 cm³ d'une solution de sulfate d'ammoniaque, apportant 2 mg. d'azote, nous avons ajouté des volumes croissants du réactif de Grigaut-Thiéry; après floculation du précipité par NaCl, nous recherchions l'ammoniaque dans les filtrats à l'aide des réactions de Nessler et de Berthelot-Lex. Ces réactions n'ont été négatives que moyennant l'emploi de 20 cm³ de réactif.

b) Pour être sûr d'éliminer ensuite tout l'excès d'iodomercurate, on doit admettre que la bile est exempte d'ammoniaque et que par conséquent les 20 cm³ de réactif utilisés se retrouvent dans le filtrat. Nous avons ajouté à cette quantité des volumes croissants d'une solution d'antipyrine à 10 ‰, en acidifiant légèrement

les mélanges comme il a été dit, et en recherchant le mercure dans les filtrats à l'aide de l'hydrosulfite ou du formol. Il a fallu, pour que ces réactions deviennent négatives, mettre en œuvre 4 cm³ de solution d'antipyrine, soit 0 gr. 40 de base.

La composition de l'iodomercurate d'antipyrine n'est pas connue et nous n'avons pas eu le loisir de l'établir, ainsi qu'on pourrait le faire en le préparant à l'état cristallisé par la méthode générale de François et Blanc [101]. La plupart des iodomercurates d'alcoïdes obtenus par ces derniers sont du type $\text{Hgl}^{12}\text{-Alc. HI}$; si le composé formé appartient à cette catégorie, les 0 gr. 30 d' Hgl^{12} que renferment 20 cm³ de réactif devraient consommer seulement 0 gr. 12 d'antipyrine, et même si on lui attribue la formule la plus riche en alcoïde parmi les quatre rencontrées par François et Blanc, $\text{Hgl}^{12}(\text{Alc. HI})^2$, la précipitation de l' Hgl^{12} n'eut encore exigé que 0 gr. 25 d'antipyrine. La dose de base nécessaire est donc supérieure à celle que la théorie permet de calculer (à moins qu'il ne s'agisse d'un autre type d'iodomercurate, ce qui n'est guère vraisemblable), et il faut employer un excès d'antipyrine. Peut-être la réaction produite est-elle réversible, de même que celle de Nessler.

8° *Comportement des acides aminés dans cette double précipitation.* — Il convenait de rechercher si les deux précipités ainsi formés successivement retiennent les acides aminés présents dans le milieu.

a) Des quantités connues de glycocolle ou de taurine ont été dissoutes dans 10 cm³ d'eau et additionnées de 20 cm³ de réactif de Nessler, de quelques gouttes de phtaléine, d'un léger excès d'acide chlorhydrique au 1/10, de 4 cm³ d'une solution d'antipyrine au 1/10 et enfin d'eau distillée q.s.p. 50 cm³. La formol-titration était pratiquée sur 40 cm³ du filtrat et le résultat multiplié par conséquent par 1,25. Voici les chiffres trouvés:

	Introduit (mg.)	Trouvé (mg.)
Glycocolle	20	19.95
id.	5	4.92
Taurine	20	21.0
id.	5	4.95

En l'absence d'ammoniaque, le réactif de Nessler ne donnait pas de précipité, dont la formation eut d'ailleurs été empêchée

par l'addition d'acide chlorhydrique; ces essais montrent donc seulement que les acides aminés ne sont pas entraînés dans une mesure appréciable par l'iodomercurate d'antipyrine.

b) Une seconde série d'essais a comporté en outre l'élimination de l'ammoniaque et des carbonates. A 10 cm³ de solution d'amino-acide, renfermant 2 mg. d'azote ammoniacal et 0 gr. 20 de carbonate neutre de soude, nous avons ajouté tout d'abord 20 cm³ de réactif de Nessler, 10 cm³ d'une solution de chlorure de baryum au 1, 10 et de l'eau distillée q.s.p. 50 cm³. Le précipité bien floclulé a été éliminé par filtration. Cette opération constitue un point délicat, car elle doit être aussi rapide que possible afin que le filtrat, de réaction forcément alcaline, ne se recarbonate pas sensiblement au contact de l'air. Puis 40 cm³ de filtrat furent acidifiés par l'acide chlorhydrique et additionnés de solution d'antipyrine; après avoir complété de nouveau à 50 cm³, on a titré l'azote aminé dans 40 cm³ de filtrat (les résultats étant cette fois multipliés par 1,56, en raison des dilutions faites).

	Introduit (mg.)	Trouvé (mg.)
Glycocolle	20	19,50
id.	5	4,90
Taurine	20	19,20
id.	5	4,85

Ces différences sont également de l'ordre de grandeur des erreurs d'expérience et ne traduisent pas une perte en acide aminé susceptible de rendre ce traitement inutilisable.

3° *Essais portant sur des solutions de sels biliaires, renfermant des acides aminés libres, de l'urée et de l'ammoniaque.* — Ces solutions possédaient une composition analogue à celle de la bile, en ce qui concerne les substances envisagées.

Solution A (en grammes par litre). — Azote aminé libre (à l'état de glycocolle) 0,304; azote ammoniacal (sulfate d'ammoniaque), 0,20; urée, 0,40; acide glycocholique (neutralisé ensuite par la soude), 6 gr.

Solution B. — Azote aminé libre (taurine), 0,150; azote ammoniacal et urée, comme en A; taurocholate de soude impur du commerce, 15 gr.

Afin de pouvoir être conservée, chaque solution fut diluée au cinquième avec de l'alcool et les dosages faits ensuite sur le produit d'évaporation de 25 cm³ de ces dilutions. Soit que les solutions aient été ou non chauffées après addition de 8 % de soude, elles ont été traitées comme précédemment, et examinées d'autre part à l'aide de la méthode gazométrique.

Ce tableau rassemble les résultats obtenus, exprimés en grammes par litre de solution primitive:

		Formol.	Gazométrie	Théorie
A	Azote aminé avant hydrolyse.	0.300	0.305	0.304
	Azote aminé après hydrolyse .	0.490	0.490	—
	Azote de l'acide biliaire. . .	0.190	0.185	—
	Acide glycocholique	6.30 (1)	5.95 (2)	6.00
B	Azote aminé avant hydrolyse .	0.147	0.155	0.150
	Azote aminé après hydrolyse .	0.364	0.375	—
	Azote du sel biliaire	0.217	0.220	—
	Acide taurocholique	7.98	8.09	—

4° *Dosage des sels biliaires dans les biles par formol-titration différentielle.* — Quoique ces résultats aient montré que les deux méthodes conduisent à des valeurs identiques, ce mode opératoire présente un défaut que nous avons déjà signalé; la première filtration, après précipitation de l'ammoniaque et des carbonates, doit porter inévitablement sur un liquide franchement alcalin, et comme, dans le cas de la bile, cette filtration est plus lente qu'au cours des essais préliminaires, le filtrat peut se recarbonater plus ou moins. Pour échapper à cet inconvénient, il faudrait n'éliminer tout d'abord que l'ammoniaque, en milieu alcalin, filtrer, puis précipiter les carbonates en milieu neutre. De toute manière, les acides biliaires, acides gras, etc., resteront à l'état de sels sodiques solubles, et risqueront de troubler les virages, comme il a été dit plus haut (p. 97), (3), à moins qu'ils ne soient eux-mêmes précipités avant la formol-titration par une acidification suffisante des solutions, ou que le titrage ne soit fait en solution diluée. Par contre, les pigments se trouvent retenus par le précipité d'iodomercurate d'antipyrine et le dernier filtrat obtenu est incolore, ce qui supprime l'emploi dangereux du noir décolorant. Sans introduire toutefois dans la technique ces filtrations sup-

(1) Calculé à l'aide du coefficient théorique 33.21.

(2) Calculé à l'aide du coefficient 32.24 (voir page 61).

(3) L'apparition d'un précipité blanc lorsque la réaction du milieu devient acide ne s'observe, à vrai dire, qu'avec des liquides d'hydrolyse, et lorsque les sels biliaires y atteignent un taux assez élevé.

plémentaires, nous avons analysé ainsi quelques biles animales, en rapprochant les résultats de ceux que fournit la méthode gazométrique.

1° 25 cm³ de filtrat alcoolique de bile à 1/5 ayant été évaporés, le résidu fut repris par 10 cm³ de soude à 8 % et la solution chauffée au bain-marie pendant 6 heures; on ajouta 20 cm³ de réactif de Nessler, 10 cm³ de solution de chlorure de baryum à 1/10 et de l'eau distillée q.s.p. 60 cm³. En utilisant un grand filtre pour hâter l'opération, on obtint 45 cm³ de filtrat. Après neutralisation par l'acide chlorhydrique au demi (eau bouillie) et addition d'un excès de 0 cm³ 3, l'iodomercurate fut précipité par 2 cm³ de solution d'antipyrine à 20 % (eau bouillie); on compléta à 60 cm³ avec de l'eau bouillie et recueillit 45 cm³ de filtrat incolore étiqueté B (azote aminé après hydrolyse).

2° Le même traitement fut appliqué à une prise d'essai identique, mais sans chauffage au bain-marie et en introduisant un peu de carbonate de soude pour augmenter le volume du précipité formé qui, sans cela, traverse les filtres. On obtient un filtrat A (azote aminé avant hydrolyse).

3° Un témoin pour la formol-titration fut préparé de la même façon, mais sans bile, et possédait donc sensiblement la même teneur en sels que les solutions A et B.

Les titrages furent faits avec une solution de baryte environ N/50 de titre connu, et les résultats exprimés en gr. d'azote des sels biliaires par litre de bile, compte tenu des dilutions pratiquées. Les mêmes désignations, A et B, furent conservées N/50 (de titre connu) et les résultats exprimés en grammes d'azote pour les dosages gazométriques. Les résultats comparatifs figurent dans ce tableau:

	Formol-titration			Gazométrie		
	A	B	Az. bil. (par différence)	A	B	Az. bil. (par différence)
Mouton IV	0.20	1.61	1.41	0.34	1.78	1.44
Porc II	0.19	2.83	2.64	0.17	2.50	2.33
Bœuf VII	0.08	1.91	1.83	0.10	1.81	1.71
Veau I	0.06	1.92	1.86	0.06	1.87	1.81
Chien I	0.12	1.52	1.40	0.15	1.53	1.38

Ces chiffres appellent les observations suivantes :

1° Les deux méthodes différentielles conduisent à des valeurs très voisines, que l'on pourrait substituer l'une à l'autre, dans la pratique, sans aucun inconvénient ;

2° Appliquée aux biles non hydrolysées, la formol-titration donne le plus souvent des résultats inférieurs à ceux de la méthode gazométrique ; cela est dans doute dû à ce fait que l'urée n'entre pas en jeu, non plus que l'ammoniaque qui est dans ce cas éliminée ;

3° Avec 3 biles sur 5, la formol-titration, après hydrolyse, a fourni des valeurs plus fortes que la gazométrie ; on ne peut suggérer ici d'explication logique, mais il convient de remarquer que la titration au formol ne saurait être appliquée sans risque à des solutions aussi pauvres en acides aminés et occupant cependant un volume d'environ 50 cm³ ;

4° L'essentiel était de s'assurer, ainsi qu'il a été dit au début de ce chapitre, du bien-fondé de la méthode par hydrolyse, en obtenant sensiblement les mêmes résultats au moyen de techniques aussi différentes que la gazométrie et la formol-titration.

5° *Dosage des sels biliaires, par la formol-titration, en un temps.* — Alors que la technique précédente substitue à la gazométrie un mode de titrage classique, la nécessité des précipitations préalables portant chaque fois sur deux échantillons de bile lui fait perdre cet avantage. On peut toutefois le lui restituer en tirant parti des expériences sur l'emploi de l'hypobromite (page 78) qui nous ont déjà permis de transformer la méthode gazométrique différentielle en une technique directe « en un temps ». L'hypobromite décomposera en effet les sels ammoniacaux, qui ne devront plus être éliminés de la façon assez compliquée à laquelle nous avons dû recourir. Tout en supprimant, comme pour la gazométrie, le dosage de l'azote aminé libre, avant hydrolyse, on n'aura plus à mettre en œuvre l'iodomercurate ni l'antipyrine, et l'on pourra introduire dans la technique une élimination des acides peu solubles, afin que le virage final ne puisse être troublé.

Mode opératoire

Pour éviter les renvois multiples aux indications précédentes, nous donnons intégralement ici la technique que toutes ces observations conduisent à établir.

I. Réactifs nécessaires

- A) Solution aqueuse de soude en plaques à 32 %.
- B) Acide chlorhydrique dilué au quart.
- C) Solution d'hypobromite de soude, obtenue avec : lessive de soude pure $\rho = 1,33:17 \text{ cm}^3$; eau distillée q.s.p. 200 cm^3 ; brome 2 cm^3 5.
- D) Eau oxygénée à 30° (100 vol.).
- E) Alcool caprylique.
- F) Acide chlorhydrique environ N/10.
- G) Solution de chlorure de baryum à 1/10.
- H) Formol neutralisé, préparé en ajoutant, à 50 cm^3 de formol du commerce, 5 cm^3 de solution de chlorure de baryum, dix gouttes de solution de phtaléine à 1 % et de la solution de soude jusqu'au rouge franc. Après 5 minutes, filtrer sur un filtre dur et ramener au rose pâle avec l'acide chlorhydrique environ N/10.
- I) Solution de baryte environ N/10, de titre exactement connu, conservée et manipulée à l'abri de l'air (burette en 1/50 fournissant des gouttes aussi petites que possible).

II. Technique

1° *Défécation alcoolique de la bile.* — À 10 cm^3 de bile, ajouter peu à peu et en agitant 30 cm^3 d'alcool à 95° , puis chauffer jusqu'à une température voisine de l'ébullition. Filtrer et laver à plusieurs reprises le précipité avec de l'alcool chaud; après refroidissement, compléter à 50 cm^3 .

2° *Traitement par l'hypobromite et hydrolyse.* — Évaporer au bain-marie, dans une capsule, 25 cm^3 de filtrat (correspondant à 5 cm^3 de bile), puis délayer le résidu dans 1 cm^3 d'eau environ. Ajouter 5 cm^3 d'hypobromite, mélanger et, après cinq minutes, ajouter quelques gouttes d'eau oxygénée et une goutte d'alcool caprylique. Faire passer le contenu de la capsule dans un tube à essai jaugé à 10 et à 20 cm^3 , laver la capsule successivement avec 2 cm^3 de solution de soude à 32 % et avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le volume du mélange dans le tube jaugé atteigne 10 cm^3 . Plonger le tube pendant 6 heures dans un bain-marie bouillant en remplaçant toutes les deux heures l'eau évaporée. Refroidir et ramener, s'il y a lieu, le volume à 10 cm^3 .

3° *Elimination des acides biliaires et des carbonates.* — Ajouter 10 cm³ d'acide chlorhydrique au demi, mélanger et refroidir; ajuster le volume à 20 cm³ avec de l'eau distillée sans tenir compte du volume occupé par le précipité gélatineux formé (1). Filtrer en recueillant 15 cm³ dans un second tube jaugé à 15 et à 25 cm³; ajouter 11 gouttes de phtaléine et alcaliniser légèrement avec la solution de soude; ajouter 2 cm³ de solution de chlorure de baryum; après 5 minutes, filtrer rapidement à travers un filtre plissé assez grand en recueillant le filtrat dans un récipient sec. Mesurer aussitôt 20 cm³ de liquide dans une fiole conique et l'acidifier légèrement avec l'acide chlorhydrique environ N/10. On peut alors attendre d'avoir un certain nombre de filtrats à analyser simultanément et étiqueter les fioles: B¹, B², etc...

4° *Formol-titration.* — Préparer un témoin en utilisant de la même façon tous ces réactifs, mais sans bile, la solution finale étant mise dans une fiole T. Ajouter dans les fioles T et B, VI gouttes de phtaléine, de la baryte jusqu'au rose pâle et 10 cm³ de formol neutralisé. Avec 0 cm³ 5 de baryte, porter le contenu de T au rouge foncé. Déterminer le volume n de baryte (en cm³) nécessaire pour amener à la même teinte rouge foncé le contenu de la fiole B (2).

Soit C le facteur de correction par lequel on doit multiplier n pour exprimer cette valeur en cm³ de solution alcaline N/10; l'azote des sels biliaires, en grammes, par litre de bile est donné par la formule (3) :

$$(n - 0,5) \times C \times 0,466 = Az \text{ par litre.}$$

Dosage comparé de sels biliaires (en azote) dans quelques biles animales par cette technique et par gazométrie en un temps.

	Formol	Gazométrie
Mouton II	2.51	2.34
Porc I	2.33	2.00
Bœuf V	1.17	1.08
Bœuf VI	2.10	2.33
Mouton III	1.60	1.52
Bœuf VIII	3.65	3.50
Mouton I	0.88	0.90

(1) La faible erreur commise ainsi dans la mesure du volume ne pourrait être évitée qu'en lavant le précipité, ce qui conduirait à effectuer la formol-titration en solution plus diluée.

(2) Le même témoin servira pour plusieurs dosages. Si le volume de la solution à amener au rouge foncé est plus fort que celui du liquide témoin, on ajoutera de l'eau bouillie à ce dernier; dans le sens contraire, on diluera en conséquence la solution à titrer.

(3) Étant donné que le liquide final correspond à 3 cm³ de bile et que 1 cm³ de baryte correspond à 0 gr. 0014 d'azote aminé, la formule développée est en effet : $(n - 0.5) \times c \times 0,0014 \times 1000 = Az \text{ par litre.}$

CHAPITRE VI

MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES

Quoique la méthode par hydrolyse ainsi modifiée permette de déterminer assez aisément la teneur en sels biliaires d'une bile ou d'un liquide duodénal, elle comporte toutefois, et même si l'on a recours à la formol-titration, une série de manipulations qui prennent un temps appréciable; nous nous en sommes nettement rendu compte en cherchant à faire pratiquer journellement, à l'hôpital, d'assez nombreux dosages, qui devenaient eux-mêmes d'autant plus instructifs qu'ils étaient plus fréquemment répétés. Il était donc utile d'établir une technique plus rapide, n'exigeant pas en outre de l'opérateur une trop grande habitude du laboratoire. Le cholestérol et les pigments biliaires étant couramment dosés par colorimétrie dans les liquides duodénaux, c'est un procédé du même type que nous avons étudié.

Nous passerons brièvement en revue, tout d'abord, les diverses réactions colorées des sels biliaires, dont certaines ont déjà été utilisées pour leur dosage, et entre lesquelles nous avons dû choisir.

I. LES RÉACTIONS COLORÉES DES SELS BILIAIRES

1° LA RÉACTION DE PETTENKOFE ET SES VARIANTES

1) *La réaction de Pettenkofer*

Cette réaction, la plus classique, a été décrite par Pettenkofer [222] en 1844. Dans sa forme originelle, elle consiste à ajouter goutte à goutte au liquide étudié environ les deux tiers de son volume d'acide sulfurique, en veillant à ce que la température du mélange ne dépasse guère 50°. On fait arriver ensuite 2 à 5 gouttes d'une solution aqueuse de sucre de canne au quart ou au cinquième, et on agite. Il se développe une coloration violet-rouge. Dans ce travail, Pettenkofer fit d'ailleurs les observations suivantes, dont l'intérêt a été souvent vérifié plus tard: la tem-

pérature produite doit être surveillée; un excès d'acide sulfurique est nuisible à cause du charbonnement qu'il provoque et de la formation d'acide sulfureux qui détruit la coloration obtenue (cet acide ne doit pas souiller l'acide sulfurique employé); les albumines seront éliminées par coagulation; si les acides biliaires sont peu abondants, on les extrait tout d'abord par l'alcool; l'acide chlorhydrique peut être substitué à l'acide sulfurique, mais la réaction est moins nette et moins intense; on peut remplacer le saccharose par le glucose ou l'amidon, et en général par toute substance fournissant du glucose sous l'action de l'acide sulfurique.

Ce mémoire a été le point de départ d'une littérature d'autant plus abondante qu'en effectuant la réaction dans les milieux biologiques, et surtout dans l'urine, les chimistes se sont heurtés à plusieurs causes d'erreur. Aux modifications ainsi apportées à la technique primitive s'ajoutent celles qui avaient pour but d'élucider le mécanisme de la réaction. Sans prétendre rassembler ici toutes ces variantes, on peut en classer de cette manière les plus importantes, en tenant compte de leur caractère essentiel.

2) *Les variantes de la réaction de Pettenkofer.*

a) *Substitution au saccharose d'autres réactifs.* — C'est surtout par le furfurol que l'on a remplacé le saccharose, ainsi que l'ont proposé presque simultanément Mylius [207] et Udransky [287]. Cette modification a été étudiée par Ville [294], comme on le verra plus loin. Elle a été employée également par Guérin [121] et tout récemment par Grégory [117]. On utilise alors soit une solution aqueuse de furfurol, comme l'indiquent par exemple certains manuels classiques (Arthus [10], Morel [203], etc.), soit une solution alcoolique. L'emploi du furfurol se retrouve dans les techniques de Meillère [196], Herzfeld et Haemmerli [142], Bariéty [16], Coquelet [69], etc. Dans la plupart des cas, ce réactif n'offre pas sur le saccharose d'autre avantage que de se prêter à la préparation de solutions alcooliques, plus faciles à conserver que les solutions aqueuses de sucre, et qu'il est d'ailleurs avantageux de renouveler fréquemment. On notera par contre que la coloration produite est parfois tout à fait différente de celle qui se développe, dans les mêmes conditions, en présence du saccharose.

On a également substitué au saccharose, en outre du glucose et de l'amidon déjà indiqués par Pettenkofer, d'autres hydrates

de carbone (1): sucre interverti, inuline (Kulz [163]), fructose (Ville [294]), rhamnose (Jolles [158]), autres pentoses (Denigès [78]), glycogène (Vahram-Achod [288]), et aussi les aldéhydes: vanilline (Ville et Derrien [295]), Inouye et Ito [151], Meillère [197]), aldéhyde anisique (Ville et Derrien [295]). Ces dernières réactions, qui diffèrent plus nettement de celle de Pettenkofer, feront l'objet d'un paragraphe spécial, ainsi que la réaction de Jolles, pour laquelle la nature de l'acide est également modifiée, et qui fournit une fluorescence plutôt qu'une coloration.

b) *Emploi d'un acide autre que l'acide sulfurique.* — Absorption faite de l'emploi de l'acide chlorhydrique (2), montré utilisable par Pettenkofer et mis en œuvre dans la technique de Jolles, la seule modification de ce genre est celle de Drechsel [85-86], qui substitua l'acide phosphorique à l'acide sulfurique pour éviter la production de teintes parasites, et en particulier le charbonnement en présence d'un excès de sucre; quoiqu'elle ait été discutée par Becker [18], cette variante offre un intérêt particulier. Elle a été proposée de nouveau par Herzfeld et Haemmerli [142], et étudiée par nous au cours de ce travail.

c) *Emploi du chauffage au bain-marie.* — Comme l'a remarqué Pettenkofer lui-même, une trop forte élévation de température s'accompagne d'un brunissement des solutions sous l'influence de l'acide sulfurique; aussi Neukomm a-t-il recommandé le chauffage au bain-marie. Divers auteurs, tels que Kulz [163], Udraznsky [287], Ville [294] (du moins pour les réactions au saccharose et au furfurol) ont toutefois continué à utiliser le dégagement de chaleur provoqué par l'addition, à la solution aqueuse étudiée, d'un volume convenable d'acide sulfurique concentré; ils évitaient cependant de dépasser une température de 60-70°. Cette façon de procéder est indiquée par plusieurs auteurs

(1) Fleig [90] a rapproché de la réaction de Pettenkofer la réaction de Baudoin pour l'huile de sésame (sucre et HCl) et aussi celle de Villavecchia et Fabris (furfurol et HCl). Il a classé un certain nombre de sucres d'après l'intensité des réactions qu'ils fournissent en présence d'acide glycocholique et d'acide sulfurique ou chlorhydrique. Parmi ces sucres figurent en outre le sorbose, la raffinose, le galactose, le maltose, le mannose et le lactose; avec ces trois derniers, la réaction est peu marquée; l'inuline qui fournit la levulose et le glucose donne aussi la réaction.

(2) Il est à noter que, dans les expériences de Fleig [91] sur le comportement de divers sucres, l'emploi de HCl a permis d'obtenir des réactions positives avec des sucres qui ne fournissaient que de faibles colorations en milieu sulfurique.

classiques (Denigès [79], Morel [203], Arthus [10], Barral [17], Pincussohn [227], etc.), et a été conservée par Coquelet [68-69] dans ses procédés de dosage. Il semble cependant préférable, surtout s'il s'agit de déterminations quantitatives, de recourir à un mode de chauffage plus facile à régler; aussi Meillère [196], Bariéty [16], Herzfeld et Hœmmerli [142] se servent-ils d'un bain-marie porté soit à 60-70°, soit à la température d'ébullition, en précisant d'autre part la durée optima du chauffage. Aldrich et Bledsoe [7] effectuent même la réaction dans une étuve chauffée à 37°.

3) Spécificité de la réaction de Pettenkofer et contrôle spectroscopique

Il est bien connu qu'en présence de saccharose ou de furfurol, et d'acide sulfurique ou chlorhydrique, un très grand nombre de substances fournissent des colorations plus ou moins analogues à celles que donnent les acides biliaires. On en trouvera de longues listes dans divers traités de chimie biologique, et dans les mémoires d'Udranszky [287] et de Fleig [91]. Il convient toutefois à notre avis d'établir une distinction, qui n'est pas faite d'ordinaire, entre les substances que l'on peut s'attendre à rencontrer dans les milieux biologiques, soit normalement, soit d'une manière accidentelle, et celles qui ne sauraient guère, semble-t-il, s'y trouver. Que la résine de gaïac, par exemple, ou l'orcine puissent fournir des réactions positives, ce fait est intéressant du point de vue de la chimie analytique, mais ne rétrécit pas pour autant les limites d'application, en analyse biologique, de la réaction de Pettenkofer. Il n'en est pas ainsi, évidemment, de nombreux composés considérés comme des constituants normaux, à dose élevée ou à l'état de traces, de la bile, du sang ou de l'urine, ou de certains médicaments susceptibles de les accompagner. Encore conviendrait-il de préciser le degré de sensibilité de la réaction, pratiquée dans des conditions déterminées, pour chacune de ses substances. Quoiqu'il en soit, on a obtenu des colorations gênantes avec les albumines, les acides oléique et stéarique, le cholestérol, les alcools isopropylique, isobutylique, amylique, le phénol, le pyrrol, le carbazol, l'acétone, la tyrosine, le tryptophane, les phosphatides, etc., toutes substances dont la présence dans les milieux étudiés est bien connue ou peut être soupçonnée; il en est de même de divers produits médicamenteux tels que le camphre, l'acide salicylique, la morphine, le

thymol, l'*n*-naphtol, le menthol, la résorcine, etc. Aussi la réaction de Pettenkofer reste-t-elle en définitive sujette à caution lorsqu'elle est effectuée dans un milieu complexe, et exige-t-elle l'élimination, au moins partielle, des substances parasites, ou l'isolement relatif des sels biliaires; son application est d'autant moins aisée que le taux de ces dernières est plus faible par rapport à celui des premières (sang et urine), tandis que l'analyse de la bile offre moins de difficultés. Ceci explique la multiplicité des techniques proposées pour la recherche des sels biliaires dans l'urine (Neukomm [212], Hoppe-Seyler, Mörner [204], Vitali [298], Draggendorff [83], Bang [14], Jolles [158], Denigès [79], Meillère [196], etc.) Depuis quelques années, le dosage des sels biliaires dans le sang attire l'attention des biochimistes qui ne peuvent mettre en œuvre une réaction colorée du type Pettenkofer sans éliminer les substances étrangères telles que le cholestérol, les graisses, les phosphatides, etc. (Coquelet [69], Aldrich et Bledsøe [7], etc.). Ce qui rend difficile ces séparations, c'est le peu de parti que, semble-t-il, l'on puisse tirer des réactions de précipitation des sels biliaires, ainsi que de leurs solubilités ou de leur insolubilité dans les solvants organiques. Après avoir tenté d'établir une méthode à peu près générale, Hammarsten [133] n'a pu lui attribuer une parfaite sécurité (1).

Des modes d'isolement plus rapides consistent à réaliser l'entraînement des sels biliaires par le noir animal (Meillère [196]), ou l'albumine (Bang [13], Vitali [298]), la caséine (Jolles [158]), ou leur précipitation par le sulfate d'ammoniaque (Meillère [196]), le sulfate de magnésie (Schmidt et Merrill [270], Rosenthal et Wislicky [247]). L'emploi du noir animal, indiqué par Meillère, a été adopté par un certain nombre d'auteurs français, tels que Bariéty [16], Fiessinger et Walter [88]. De toute manière,

(1) Pour donner une idée de la complexité de cette technique de recherche des sels biliaires dans le sang et les sérosités, nous en rappelons brièvement les temps successifs : défécation par l'alcool ; lavage du précipité ; évaporation du filtrat ; reprise par l'alcool absolu ; traitement du résidu par l'éther ; dissolution dans l'alcool de la partie insoluble dans l'éther ; précipitation par l'acétate de plomb ammoniacal, en évitant un excès de réactif ; lavage à l'eau ; traitement du précipité par l'alcool bouillant ; évaporation en présence de soude ; reprise par l'alcool ; concentration et précipitation par un excès d'éther ; le précipité résineux peut cristalliser et servir à la réaction de Pettenkofer. Quand les sels biliaires sont très peu abondants, l'éther ne les précipite pas ; alors on opère ainsi : traitement par H_2S de la solution alcoolique de sels plombiques ; élimination des acides gras par le benzol (qui peut entraîner des traces de sels biliaires) ; ou bien traitement par l'eau de baryte et précipitation de la baryte par CO_2 ; la réaction de Pettenkofer est pratiquée sur le résidu d'évaporation du filtrat. Hammarsten décèle ainsi 2 mg. de sels biliaires dans 100 cm^3 de liquide.

on ne réalise pas ainsi un isolement rigoureux des sels biliaries, et le manque de spécificité de la réaction de Pettenkofer ne doit pas être perdu de vue.

Pour éviter autant que possible la production de teintes parasites, il convient sans doute de tenir compte des modifications déjà rappelées, concernant le mode de chauffage et surtout la nature de l'acide mis en œuvre. Mais, dans la plupart des cas, c'est l'examen spectroscopique qui montrera si la coloration observée est due ou non à des sels biliaries.

A la réaction donnée par ces derniers correspond en effet un spectre particulier. Schenk [257] a signalé que, si l'on dilue avec de l'alcool la solution colorée obtenue selon Pettenkofer, de telle sorte que la région violette du spectre soit seule absorbée, il apparaît une bande d'absorption en F et une autre entre D et E (plus près de E). La raie en D décrite par Bogomoloff [27] serait due aux pigments biliaries. En solution concentrée, on ne voit plus que la bande voisine de E. Le même spectre fut observé par Udransky [287], avec en outre une bande étroite entre C et D, lorsque la réaction est effectuée avec précaution. En utilisant d'une part le saccharose, et d'autre part le furfurol, Ville [294] décrivit plus tard deux spectres légèrement différents l'un de l'autre; avec le saccharose, il obtint une large bande dans le vert, à cheval sur λ 528, à laquelle s'ajoute ensuite une bande moins nette dans le jaune à $\lambda = 546$ (1). Comme le rappellent, d'après Ville, Derrien et Fontès [81], le spectre subit des modifications suivant les proportions de réactif en présence; la façon dont la réaction est elle-même pratiquée intervient également. C'est ainsi que Denigès [79] signale une bande dans le bleu-vert, une autre au début du rouge, et une troisième entre les deux; Arthus [10] décrit une bande en E et une autre en F, laquelle, en solution concentrée, couvre toute la partie droite du spectre; en opérant, selon Morel [203], on doit obtenir une bande entre B et E, et une seconde à gauche de F; la technique de Gilbert, Chabrol et Bénard [110] et celle de Bariéty [16] fournissent une bande à $\lambda = 515$. Ayant nous-même appliqué à l'acide cholalique diverses variantes de la réaction de Pettenkofer, nous avons observé des spectres différents, qui seront décrits plus loin. Il résulte de ces citations et de nos propres observations que la bande d'absorption caractéristique des sels biliaries, et

(1) L'étude spectrophotométrique des deux spectres a été faite (avec l'acide cholalique) par Bardachzi [15].

que l'on obtient avec la plupart des techniques classiques, est située en E ou au voisinage de cette ligne, c'est-à-dire à la limite du jaune et du vert; il en résulte en outre que lorsqu'on veut rechercher les sels biliaires suivant une certaine variante de la réaction de Pettenkofer, on doit tout d'abord préciser le spectre qui correspond à cette variante, en opérant par exemple sur l'acide cholalique pur. Grâce à ce contrôle spectroscopique, la spécificité de la réaction se trouve grandement accrue.

4) Mécanisme de la réaction de Pettenkofer

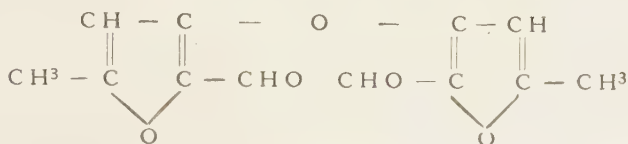
Ayant constaté que l'on pouvait substituer le furfural au saccharose, pour la recherche des acides biliaires et, inversement, que l'acide cholalique était utilisable pour la recherche du furfural, Mylius [207] admit que c'était ce composé qui, dans la technique habituelle, entraînait en réaction avec l'acide biliaire. Si l'on fait agir en effet l'acide sulfurique sur le saccharose et si l'on recueille les produits qui prennent naissance, le distillat donne, avec les sels biliaires, la réaction de Pettenkofer; des divers composés formés: acétone, oxyde de mésityle, phorone, furfural, c'est ce dernier qui intervient. Le saccharose n'a donc pour rôle que de fournir du furfural sous l'action de l'acide sulfurique. La réaction de Pettenkofer étant positive avec l'acide oléique, les pétroles, l'alcool allylique et d'autres alcools pouvant perdre une molécule d'eau, Mylius supposa d'autre part que l'acide cholalique se transforme au préalable en quelque dérivé non saturé.

De ce que le saccharose et le furfural conduisent à des spectres différents (p. 119), Ville [294] déduisit que, dans la réaction classique, la part prépondérante n'appartenait pas au furfural, mais aux produits résultant de l'hydrolyse du saccharose, et en particulier au fructose. Puis Ville et Derrien [296] estimèrent qu'il s'agissait d'un corps intermédiaire entre le fructose et l'acide lévulique, terme final de la décomposition du fructose par les acides. L'étude de cette décomposition, ayant permis d'isoler l'oxyméthyl-furfural:



ces auteurs obtinrent, avec cette aldéhyde et l'acide cholalique, la même coloration et le même spectre qu'avec le fructose. Comme

l'aldéhyde fixe très aisément une molécule d'eau pour donner l'oxyde :



on pouvait supposer que, plus exactement, c'était ce dernier qui entraînait en jeu. Ville et Derrien l'ont également préparé à l'état pur et noté la même coloration qu'avec le fructose. Ils ont conclu de leurs expériences que, dans la réaction de Pettenkofer, ce sont ces aldéhydes furaniques qui se condensent avec l'acide cholalique.

Il n'est pas toutefois impossible, d'après Fleig [91], de mettre en cause la formation intermédiaire du furfural, car les divers sucres donnent d'autant mieux la réaction de Pettenkofer qu'ils fournissent plus facilement du furfural.

Sans prétendre établir une distinction rigoureuse entre les réactions qui vont suivre (2° et 3°), dont la nature n'est pas élucidée, et celles qui précèdent, nous les séparons néanmoins ici pour plus de clarté. (1)

2° LES RÉACTIONS DONNÉES PAR LES ALDÉHYDES AROMATIQUES

1) Réactions de Ville et Derrien. — (Vanilline et aldéhyde anisique)

Ces auteurs [295] ont cherché à substituer au furfural et au saccharose d'autres aldéhydes. A quelques gouttes de bile ou de solution d'acide biliaire, ils ajoutent III gouttes de solution alcoolique au cinquième de vanilline ou d'aldéhyde anisique et 10 cm³ d'acide sulfurique au demi (en volumes); puis ils chauffent au bain-marie bouillant pendant environ une demi-minute, jusqu'à ce que la partie supérieure du mélange se colore. Si les teintes sont trop intenses pour être examinées au spectroscope, on dilue avec de l'acide au demi. Avec la vanilline, la coloration est rouge groseille, et le spectre montre une bande dans le jaune-vert, aux environs de $\lambda = 540$; l'aldéhyde anisique donne une teinte rose éosine,

(1) Alors que la réaction de Pettenkofer ou ses variantes sont décrites dans la plupart des ouvrages classiques, les autres techniques sont moins connues; aussi les reproduisons-nous avec quelque détail.

sans fluorescence, avec une bande très nette vers $\lambda = 520$. Si les sels biliaires ne sont présents qu'à l'état de traces, on ajoute à une goutte de leur solution, évaporée dans un verre de montre, I à II gouttes de solution alcoolique diluée d'aldéhyde (0 gr. 152 de vanilline ou 0 g. 136 d'aldéhyde pour 50 cm³ d'alcool à 95°) et I goutte d'acide sulfurique concentré. La coloration est étudiée à l'aide d'un micro-spectroscope. La réaction est plus sensible avec l'aldéhyde anisique qu'avec la vanilline : on observe une bande visible avec 0 mg. 043 d'acide cholalique, et une coloration faible avec 0 mg. 026.

Ville et Derrien font remarquer que les albumines donnent une coloration violette avec la vanilline sulfurique (Rohde), mais que le spectre est différent ($\lambda = 559$). L'aldéhyde anisique fournit de même une réaction positive avec le blanc d'œuf et le tryptophane. Les cholestérines se comportent, avec les deux aldéhydes, d'une manière très voisine de celle des acides biliaires.

2) Réaction d'Inouye et Ito (Vanilline) [151]

A 2 cm³ de la solution aqueuse étudiée, on ajoute 3 centigrammes de vanilline et, avec précaution, 2 cm³ d'acide sulfurique concentré; il apparaît un anneau rouge à la limite de séparation. Après agitation, le liquide se colore en rouge, puis en violet-rouge. Ce liquide étant dilué avec de l'acide acétique, on observe une large bande en D, laquelle s'étend surtout vers C, mais aussi vers E; Inouye et Ito ont pu déceler ainsi l'acide cholalique à une concentration de 1/22.000 et les acides glycocholique et taurocholique à des taux de 1/15.000 et 1/11.000 (1).

3) Réaction de Meillère [196] (Vanilline)

Cet auteur a constaté que, si l'on traite, à 50-60°, les sels biliaires par le réactif de Ronceray (2), il se développe une coloration rouge-orangé très intense, virant peu à peu au rouge-sang et présentant au spectroscope une large bande d'absorption dans le vert.

(1) Ce grand écart entre les concentrations notées par Inouye et Ito pour l'acide cholalique et pour les acides couplés s'explique sans doute par l'emploi d'acides glycocholique et taurocholique du commerce (Merck).

(2) Le réactif de Ronceray [242] est obtenu en mettant un excès de vanilline en présence d'acide sulfurique au demi.

Ces réactions à la vanilline n'étant pas spécifiques des sels biliaires, on n'en a pas tiré parti en analyse biologique.

4) Réaction de Jolles (Rhamnose) [158]

Jolles a proposé de substituer à la réaction de Pettenkofer une nouvelle réaction ainsi conduite, et qui lui serait préférable. On ajoute à 2 ou 3 cm³ de solution aqueuse de sel biliaire, I ou II gouttes de solution de rhamnose à 5 %, et 2 ou 3 cm³ d'acide chlorhydrique concentré; une ébullition modérée fait apparaître une coloration rose, puis une belle fluorescence verte. Cette dernière est accentuée par addition de 1 à 2 cm³ d'éther et agitation. En modifiant légèrement les proportions des réactifs, on obtient encore une réaction positive avec 0 mg. 1 d'acide cholalique dissous dans 1 cm³ d'alcool. Avec l'acide sulfurique, la coloration rouge est plus intense, mais ne se transforme pas en une fluorescence verte. Le méthyl-furfurol peut être employé, mais sans avantage, au lieu du rhamnose.

N'était la fluorescence, cette réaction ne se distinguerait pas sensiblement de celle de Pettenkofer, puisqu'on peut remplacer dans cette dernière le saccharose par un pentose, et l'acide sulfurique par l'acide chlorhydrique. Neuberg a fait observer [211] qu'elle se rapproche beaucoup de la réaction indiquée par Neuberg et de Rauchwerger [209] pour la cholestérine, les acides biliaires et quelques autres composés du groupe des terpènes (obtention d'une coloration rouge framboise avec le rhamnose et l'acide sulfurique; bande d'absorption entre b et E); elle n'est donc pas spécifique des sels biliaires (1).

5) Réaction de Mylius (à l'iode) [208]

A 1 cm³ d'une solution décimormale d'iode, on ajoute 2 centigrammes d'acide cholalique dissous dans 0 cm³ 5 d'alcool, puis on dilue avec de l'eau; le mélange brunit et il apparaît de fines aiguilles bleues mordorées.

Ces aiguilles sont formées du sel de potassium de l'acide iodo-cholalique $(C^{24} H^{40} O^5 I)^4 KI - n H^2 O$.

La faible sensibilité de cette réaction est énormément accrue en présence d'un excès de chlorure de sodium (Ville [297]). Cet auteur a pu déceler 0 mg. 5 et même 0 mg. 2 d'acide cholalique,

(1) Sur l'emploi de cette réaction pour la recherche des sels biliaires dans l'urine, voir Jolles [158], Wittels et Welwart [338], Fritsch [104].

en opérant ainsi : l'acide cholalique est dissous dans une petite capsule avec 0 cm³ 1 d'alcool; si l'on ajoute 1 cm³ d'un réactif obtenu en mélangeant 0 cm³ 5 d'iode N et 200 cm³ de solution de NaCl à 30 ‰, les parois de la capsule se tapissent de fines aiguilles bleues.

Nous avons répété nous-même, avec un plein succès, les expériences de Ville, et observé que cette réaction était positive avec une dose d'acide cholalique inférieure à celle qu'indique cet auteur. Elle n'est malheureusement pas utilisable pour le dosage des sels biliaires, car elle n'est donnée que par le seul acide cholalique, distingué ainsi par Mylius des acides biliaires proprement dits. Quoiqu'il soit évidemment aisé de transformer ces derniers, par hydrolyse, en acide cholalique, la réaction reste impossible à mettre en œuvre, car elle ne se produit qu'avec l'acide pur.

II. LE COMPORTEMENT DES DIVERS ACIDES BILIAIRES DANS LES RÉACTIONS COLORÉES CLASSIQUES

Quoique les expériences dont nous allons parler nous aient été suggérées par l'étude, décrite plus loin, d'une méthode colorimétrique de dosage, nous les exposons ici tout d'abord, en raison de leur intérêt théorique. On admet en effet implicitement que les différents sels biliaires se comportent de la même manière dans la réaction de Pettenkofer, ou dans l'une quelconque de ses variantes et que, par conséquent, tous les sels biliaires présents dans le milieu analysé se trouvent décelés pour ainsi dire « en bloc ». Quoique la composition des diverses biles soit encore mal établie, on sait cependant que la bile humaine, qui mérite évidemment une attention particulière, renferme en proportions appréciables d'autres sels biliaires que les glycocholates et les taurocholates. Wieland et ses élèves ont bien montré l'existence, dans cette bile, de l'acide désoxycholique combiné aux acides gras pour former l'acide choléinique depuis longtemps connu (p. 13). Ils en ont extrait également, avec des traces d'acide lithocholique, l'acide anthrope-(chéno)-désoxycholique. On peut donc se demander, ainsi que les observations suivantes nous y ont conduit, si ces acides doivent être parfaitement assimilés à l'acide cholalique, en ce qui concerne les réactions colorées classiques.

Lorsqu'on dose les sels biliaires, dans une même bile, à la fois par la méthode gazométrique (p. 72) et par notre méthode

colorimétrique (p. 155), on obtient parfois un chiffre plus élevé dans le premier cas que dans le second. Entre autres explications, il se peut, disions-nous dans une note antérieure [57], que « le groupe des sels biliaires soit plus complexe qu'on ne l'admet généralement ». Mais il y a plus : si l'on cherche à doser par colorimétrie les sels biliaires dans des biles de porc, on n'observe que des colorations remarquablement faibles, et nullement en rapport avec la teneur élevée des biles vésiculaires en sels biliaires, qu'indique d'autre part le dosage gazométrique. Faut-il admettre que l'acide hyocholalique, ou plus exactement l'acide hyoglyco-désoxycholique ne réagit pas, avec le furfurol et l'acide phosphorique, de la même manière que l'acide cholalique, ou du moins ne réagit que beaucoup moins intensément ? Cet acide (ac. dioxy-3-13 cholanique) possède en effet une formule différente de celle de l'acide cholalique (ac. trioxy-3-7-13 cholanique); or, il en est précisément de même de l'acide désoxycholique (ac. dioxy-3-7 cholanique) et de l'acide anthrope-désoxycholique (ac. dioxy-3-12 cholanique).

Nous avons donc comparé les réactions colorées que fournissent ces derniers acides avec celles que donne, dans les mêmes conditions, l'acide cholalique. Nous y avons joint l'acide hyoglyco-désoxycholique et son sel de soude, extraits de la bile de porc par le procédé de Hammarsten, ainsi qu'un échantillon d'hyoglycocholate de soude provenant du laboratoire de M. le Professeur Grimbart (1).

Comportement différent de ces acides dans les réactions colorées. — En opérant chaque fois sur un milligramme d'acide biliaire, nous avons effectué les sept réactions suivantes, dont les résultats sont rassemblés dans le tableau final.

TECHNIQUE I. — *Réaction de Pettenkofer avec saccharose et acide sulfurique.* — Le produit est chauffé à 70° pendant 4 minutes avec 2 cm³ d'acide sulfurique au demi et une goutte d'une solution aqueuse de saccharose de 1 %.

TECHNIQUE II. — *Variante Mylius-Udranszky (furfurol et acide sulfurique) selon Bariéty.* — Le produit est chauffé à 70° pendant 4 minutes avec 5 cm³ d'acide sulfurique au demi et une goutte de solution de furfurol à 2 p. 100.

(1) Nous n'avons pu également disposer d'acide lithocholique (oxy-3-cholannique), qui n'existe d'ailleurs qu'à l'état de traces dans la bile et qui se comporterait très probablement comme les acides essayés.

TECHNIQUE III. — *Variante Herzfeld-Haemmerli, selon la technique donnée plus loin.* — Le produit, dissous dans 1 cm³ d'alcool, est chauffé au bain-marie bouillant pendant 5 minutes avec 3 cm³ 5 d'acide phosphorique sirupeux et 0 cm³ 5 d'une solution alcoolique de furfural à 1 p. 100.

TECHNIQUE IV. — *Variante avec saccharose et acide phosphorique en présence d'alcool.* — Le produit, dissous dans 1 cm³ d'alcool, est chauffé au bain-marie bouillant pendant 5 minutes avec 2 cm³ d'acide phosphorique sirupeux et une goutte de solution de saccharose à 1 p. 100.

TECHNIQUE V. — *Variante avec furfural et acide sulfurique en présence d'alcool.* — Le produit, dissous dans 1 cm³ d'alcool, est chauffé à 70° pendant 4 minutes avec 5 cm³ d'acide sulfurique au demi et une goutte de solution de furfural à 2 p. 100.

TECHNIQUE VI. — *Réaction à la vanilline de Inouye et Ito, et Meillère.* — Le produit est chauffé à 70° pendant 4 minutes avec 2 cm³ d'acide sulfurique au demi renfermant 1 p. 100 de vanilline.

TECHNIQUE VII. — *Réaction au rhamnose de Jolles.* — Le produit, dissous dans 1 cm³ d'alcool, est chauffé à l'ébullition pendant 2 minutes avec 1 cm³ d'acide chlorhydrique et une goutte de solution de rhamnose à 5 p. 100. La coloration rose développée fait place à une fluorescence verte qu'accentue l'addition, après refroidissement, de 2 cm³ d'éther.

Les colorations développées dans chaque série d'expériences sont indiquées dans ce tableau :

	I	II	III	IV	V	VI	VII
<i>Acide cholalique</i>	Rouge foncé	Rouge vineux	Bleu foncé	Vieux rose	Rouge foncé	Rouge foncé	Rouge, puis fluorescence
<i>Acide désoxycholique</i> . .	Rose pâle	Rose	Bleu vert pâle	Jaune champagne	Rose foncé	Rose foncé	Rose fugace, puis fluorescence
<i>Acide anthro-po-désoxycholique</i>	Jaune champagne	Rose pâle	id.	id.	Rose pâle	Rose pâle	Jaune champagne
<i>Acide hyoglyco-désoxycholique</i>	id.	Rose très pâle	Gris vert pâle	id.	Rose très pâle	Jaune champagne	id.
<i>Hyoglyco-désoxycholate de soude</i>	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.
<i>Hyocholate de soude</i> . .	id.	id.	id.	id.	id.	id.	id.

Contrôle spectroscopique des réactions de l'acide cholalique.
 — Après avoir ainsi constaté que seul l'acide cholalique donnait des réactions intenses, nous avons examiné au spectroscope chaque solution colorée. Il était à prévoir que les spectres d'absorption offriraient des différences marquées, puisque, comme on le sait, l'apparition de certaines bandes est liée à la proportion respective des substances mises en présence. Toutes choses égales d'ailleurs, la netteté des spectres dépend en outre de la concentration du dérivé coloré, que l'on détermine d'ordinaire par tâtonnements, en diluant progressivement le liquide étudié. Il nous a semblé plus simple, et plus sûr, de nous servir de l'appareil de Baudoin et Bénard et de faire varier, au lieu de la concentration, l'épaisseur de liquide traversée par les rayons lumineux. Cette façon de procéder permet des observations faciles, malgré le léger trouble présenté par certaines solutions. L'appareil employé portait une graduation de repérage dont nous avons établi de la manière habituelle la correspondance en longueurs d'onde. De même qu'avec la plupart des petits spectroscopes à vision directe, les bandes ne pouvaient guère être perçues qu'entre l'orangé et l'indigo.

Chaque description de spectre est ainsi précédée de l'indication de l'épaisseur établie entre le fond des godets et l'extrémité des plongeurs.

TECHNIQUE I (observation sous 5 mm.). — Une bande à cheval sur la raie E et s'étendant surtout à droite un peu au delà de 515; une très légère bande à 490.

TECHNIQUE II (observation sous 3 mm.). — Une bande à droite de E, à cheval sur 515; elle s'étend en s'estompant jusqu'à 500.

TECHNIQUE III. — On ne constate aucune bande, quelle que soit l'épaisseur.

TECHNIQUE IV (observation sous 25 mm.). — Une bande étroite en D et une autre plus large, mais moins nette, en E; la partie droite du spectre à partir de 490 est absorbée.

TECHNIQUE V (observation sous 5 mm.). — Une bande à droite de E et à cheval sur 515; elle s'étend jusqu'à 490. Une seconde bande à droite de D, à 575.

TECHNIQUE VI (observation sous 7 mm.). — Une bande à droite de D à cheval sur 580. Toute la partie droite du spectre est absorbée, à partir de 545.

TECHNIQUE VII (observation sous 10 mm.). — Une bande à cheval sur E; toute la région du spectre à droite de 520 est absorbée.

On voit que chaque technique fournit un spectre qui lui est propre et que la bande d'absorption le plus fréquemment rencontrée, du moins dans les réactions dérivant directement de celle de Pettenkofer, est située près de la raie E, à la longueur d'onde 515. Comme l'a montré Bariéty, cette bande est particulièrement nette lorsqu'on suit le mode opératoire appelé ici « technique II »; ce dernier mode est donc à recommander pour la recherche des sels biliaires.

En conclusion de ces expériences, ce qu'il convient en définitive de noter, c'est que, dans les conditions habituellement réalisées, les réactions colorées des acides biliaires doivent être rapportées surtout à l'acide cholalique; les autres acides étudiés n'interviennent que pour une part beaucoup plus faible (1). Comme les sels biliaires dérivés de l'acide cholalique prédominent largement, autant qu'on peut en juger, dans la bile humaine, les constatations que ces réactions permettent journellement de faire conservent tout leur intérêt, mais le comportement différent des composés voisins doit être pris en considération dans les dosages colorimétriques.

III. APPLICATIONS DÉJÀ FAITES DE CES RÉACTIONS COLORÉES AU DOSAGE DES SELS BILIAIRES

C'est surtout pour la recherche ou le dosage des sels biliaires dans le sang que l'on a eu recours à des réactions colorées. On peut citer ainsi les méthodes de Moleschott [202]), Lehmann [172]), Blankenhorn [24]), Gilbert, Chabrol et Bénard [110], Petren [221], Hoover et Blankenhorn [143], Kuf-

(1) Ceci ne contredit pas cette observation de Mylius [207] que la réaction au furfurol est donnée par l'acide choléinique. L'élément essentiel de ce dernier, à savoir l'acide désoxycholique, fournit bien la réaction, mais beaucoup moins intensément, à dose égale, que ne le fait l'acide cholalique. La différence est d'ordre quantitatif plutôt que qualitatif. On peut remarquer en outre que, suivant Wieland et Sorge, l'acide choléinique renferme des acides gras susceptibles d'intervenir pour leur compte, et en particulier de l'acide oléique.

ferath [162], Tashiro [282], Herzfeld et Haemmerli [142], Coquelet [69], Aldrich et Bledsoe [7], qui utilisent diverses variantes de la réaction de Pettenkofer. Perlzweig et Baron [220] ont tiré parti, dans le même but, d'une réaction colorée donnée par les sels biliaires avec l'anhydride acétique et l'acide sulfurique, tandis que Szilard [281] a décrit une méthode indirecte, consistant à précipiter les sels biliaires (ou plus exactement les glycocholates) par le chlorure ferrique et à doser le fer par colorimétrie.

En ce qui concerne l'analyse de la bile et du liquide duodénal, les descriptions précises sont moins nombreuses. Il est tout d'abord possible d'utiliser une des variantes de la réaction de Pettenkofer, suivant la méthode de la réaction-limite, en cherchant jusqu'à quelle dilution doit être amenée la bile pour que soit observée une réaction à peine perceptible, correspondant elle-même à une teneur en sels biliaires préalablement déterminée. Cette façon de procéder, qui ne permet sans doute qu'une approximation grossière, semblait convenir toutefois à des examens cliniques, car elle n'exige qu'un matériel très restreint et des manipulations simples. Elle a été proposée en particulier, du moins dans son principe, par divers auteurs de thèses sur le tubage duodénal (Libert [182], Gambillard [107]). La méthode d'Herzfeld et Haemmerli, que nous décrivons plus loin, est également basée sur la recherche de la réaction-limite, effectuée dans des conditions bien définies.

L'emploi du colorimètre permettant des mesures plus exactes, il était rationnel d'y recourir comme nous l'avons fait. Pendant l'exécution de ce travail, des procédés de ce genre ont été publiés par Coquelet et par Aldrich et Bledsoe. Après avoir exposé le mode opératoire de Herzfeld et Haemmerli, qui est à la base de notre propre technique, nous reproduisons ces deux nouvelles méthodes (1).

1^o Méthode de Herzfeld et Haemmerli [142]

Ces auteurs ont constaté que si, dans la réaction au furfural, on remplace l'acide sulfurique par l'acide phosphorique (2), il se développe une teinte allant du bleu foncé au vert bleuâtre,

(1) Les méthodes de McClure [187], dont nous n'avons pu consulter les descriptions, semblent appartenir au même groupe.

(2) Comme on l'a vu p. 116, l'idée de cette substitution appartient en réalité à Drechsel, qui utilisait, à vrai dire, le saccharose.

suisant que les sels biliaires sont plus ou moins abondants. Cette réaction, ajoutent-ils, paraît spécifique des acides biliaires, car les lipoides, les protéines, les graisses et les hydrates de carbone n'interviennent pas, pourvu que le chauffage au bain-marie bouillant ne soit pas trop prolongé. Les auteurs appliquent ce mode opératoire au dosage clinique des sels biliaires dans les urines (après précipitation plombique, s'il est nécessaire), dans le sang (après élimination des protéines par l'alcool), dans les fèces et les tissus (après extraction alcoolique en présence de CO_2NaH). Sans modifier la technique, Lepehne [177] la fit servir de la manière suivante à l'étude du suc duodénal:

Dans une série de petits tubes (de 5 à 10), on introduit, sauf dans le tube 1, 1 cm^3 d'eau; on mesure, dans les tubes 1 et 2, 1 cm^3 de bile diluée au 1/10; on agite et l'on enlève 1 cm^3 au contenu du tube 2, pour le verser dans le tube 3, et ainsi de suite jusqu'au dernier tube. On ajoute alors dans chaque tube 0 cm^3 5 d'une solution de furfurol à 1 % dans l'alcool absolu, puis 2 cm^3 d'acide phosphorique à 84 %. Tous les tubes sont plongés dans un bain-marie bouillant pendant cinq à six minutes. On note enfin dans quel tube est encore perceptible une coloration brun-verdâtre.

Cette teinte limite correspondant, suivant Herzfeld et Haemmerli, à 0 mg. 0625 de sels biliaires, ce tableau indique la teneur en sels de la dilution:

Tube 1	0 mg. 0625
— 2	0 mg. 125
— 3	0 mg. 250
— 4	0 mg. 500
— 5	1 mg.

Si c'est, par exemple, le tube 4 qui présente la réaction limite (0 mg. 0625), le tube 1 renferme lui-même 0 mg. 50 de sels biliaires et, en tenant compte de la dilution pratiquée (1/10), on calcule que 100 cm^3 de bile contiennent 500 milligrammes de sels.

Nous considérons cette méthode comme peu pratique, même pour des estimations approximatives, à cause de la difficulté qu'offre l'appréciation de la teinte limite. Il se superpose à cette dernière une coloration brunâtre, qui oblige à préparer une série de tubes témoins ne renfermant pas de furfurol. La lecture reste encore assez pénible, alors qu'en situant la teinte limite dans un certain tube plutôt que dans le tube voisin, on commet une erreur

du simple au double. De plus, cette façon de procéder devient vite fastidieuse, surtout lorsqu'un certain nombre de biles sont analysées à la fois, ce qui multiplie les dilutions à essayer.

2° Méthode de Coquelet [69]

O. Coquelet a tout d'abord recherché dans quelles conditions l'acide glycocholique, et aussi le cholestérol, fournissent, avec le furfural et l'acide sulfurique, une coloration bleue intense.

Il faut une élévation de température atteignant 120 à 160°, maintenue très peu de temps, et que l'on obtient en mélangeant brusquement l'acide sulfurique et la solution alcoolique étudiée. Les proportions les plus favorables sont les suivantes : 1 volume de solution alcoolique de substance, 0,1 vol. de solution alcoolique de furfural à 1 % et 1 volume d'acide sulfurique concentré. L'intensité des colorations obtenues étant proportionnelle à la quantité de substance mise en œuvre, cet auteur utilisa ce mode opératoire pour le dosage colorimétrique du cholestérol [68], d'une part, et des sels biliaires, d'autre part, dans la bile et dans le sang. Voici comment il procéda dans le cas de la bile :

« Il faut prélever une quantité de bile renfermant de 0,5 à 2 mg. de sels biliaires et prendre des parties aliquotes pour effectuer 2 ou 3 dosages parallèles. Pour la bile de vésicule, on prendra de 0 cm³ 05 à 0 cm³ 1; pour la bile de fistule ou de sondage duodénal, 0,25 à 1 cm³, ou plusieurs cm³ suivant la richesse présumée. La bile, diluée si c'est nécessaire, est agitée avec de l'éther en présence d'une quantité suffisante de NaOH à 5 % pour obtenir une réaction fortement alcaline. On décante la partie aqueuse et on l'évapore à sec au bain-marie après avoir neutralisé partiellement l'alcalinité par l'acide oxalique un peu avant d'atteindre la siccité complète. Le résidu est extrait pendant dix minutes au chloroforme sec; on lave 2 fois au chloroforme. Les liquides alcooliques réunis dans un tube sont évaporés à sec à basse température. Le résidu est dissous dans une quantité connue d'alcool et la réaction furfural-sulfurique est exécutée sur 0 cm³ 5 de cette solution alcoolique. Pour les biles très concentrées (biles de vésicules), on peut recevoir 0 cm³ 1 de l'échantillon sur du buvard taré, on sèche, on extrait par l'eau, on évapore à sec au bain-marie la solution aqueuse, on reprend le résidu par une quantité connue d'alcool et on fait le dosage sur 0 cm³ 5 de cette solution. Pour les biles riches en mucines ou en protéines (suppuration), on commence par traiter l'échantillon

par quatre volumes d'alcool et l'on procède ensuite comme pour le sang. » Pour ne pas étendre cette citation, nous résumons seulement les phases successives du dosage dans ce dernier cas : évaporation du filtrat alcoolique en présence de NaOH avec neutralisation partielle par l'acide oxalique; extraction par le chloroforme; évaporation du chloroforme; extraction par l'eau; évaporation de la solution aqueuse; reprise du résidu par le chloroforme; évaporation du chloroforme et redissolution des sels biliaires dans l'alcool pour le dosage colorimétrique.

« On met dans un tube à essais 0 cm³ 5 de solution de sels biliaires, on ajoute 0 cm³ 1 d'une solution alcoolique de furfural à 1 % et on laisse couler lentement d'une micro-burette 0 cm³ 5 d'acide sulfurique concentré, le long des parois du tube, de telle façon que l'alcool et l'acide se superposent sans se mélanger. On traite l'étalon de la même manière. On mélange brusquement le contenu des tubes et immédiatement on ajoute 5 cm³ d'un réactif composé de 100 volumes de chloroforme et de 40 volumes d'alcool. Dix minutes après, on fait la lecture au colorimètre ». — « La loi de proportionnalité classique est applicable aux solutions très voisines de la concentration de l'étalon, mais les résultats s'en écartent légèrement quand on sort des limites suivantes : 60 p. 100 et 150 p. 100 de l'étalon. En pratique, il faut donc préparer, pour chaque dosage, plusieurs étalons, ou bien établir une fois pour toutes une courbe de correction sur papier millimétrique. » En opérant sur des solutions pures, Coquelet a obtenu une approximation de 2 à 3 p. 100.

Ces manipulations assez longues sont rendues nécessaires par ce fait que la réaction utilisée est commune au cholestérol et aux sels biliaires, qui coexistent dans la bile. N'ayant pas étudié systématiquement les diverses phases de cette méthode, nous ne pouvons porter sur elle un jugement motivé, mais il semble que ces traitements successifs, qui doivent être conduits avec beaucoup de soin, la rendent un peu longue et délicate pour les examens cliniques à faire en série.

3° Méthode de Aldrich et Bledsoe [7]

Au cours d'un travail sur l'application de la réaction de Pettenkofer au dosage des sels biliaires dans le sang, Aldrich et Bledsoe ont été amenés à doser ces composés dans la bile, afin de préciser la valeur de leur technique. Tandis que, pour l'examen du sang, il faut éliminer le cholestérol et les graisses par

extraction étherée en présence de baryte, cette opération délicate peut être supprimée dans l'analyse de la bile.

Cette dernière est traitée par l'alcool bouillant; après refroidissement, on ajoute de l'alcool jusqu'à ce que la bile se trouve diluée à 1/200. On décolore le filtrat par la norite, en utilisant 50 mg. de celle-ci pour 35 cm³ de solution alcoolique, et on filtre de nouveau. Une portion aliquote renfermant de 0 mg. 2 à 0 mg. 4 d'acides biliaires est évaporée dans un bécher de 100 cm³, sur une plaque chauffée électriquement. On ajoute au résidu 0 cm³ 4 d'une solution de saccharose à 1 % et 8 cm³ d'acide sulfurique à 60 % (en volumes). Le bécher est ensuite maintenu, pendant une heure, dans une étuve à 37°, puis refroidi dans la glace, à l'abri de la lumière. On traite de même des solutions alcooliques étalons d'acide glycocholique. La teinte produite variant du jaune légèrement rose au rouge pourpre foncé suivant la quantité présente de sels biliaires, la comparaison colorimétrique est assez délicate (« laborious », écrivent les auteurs), même si l'on utilise un colorimètre d'Autenrieth-Hellige avec un « coin » de compensation garni d'une solution jaune (ne renfermant que du saccharose et de l'acide sulfurique) chauffée à 37°. Aldrich et Bledsoe ont obtenu ainsi des résultats voisins de ceux que fournissaient, pour les mêmes biles, les méthodes de Schmidt et Dart (p. 56) et de Rosenthal et Lauterbach (p. 86). En nous servant d'un colorimètre du type Dubosq, d'un modèle courant en France, nous n'avons pu faire par ce procédé aucun dosage satisfaisant (1).

IV. ETUDE D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE

De toutes les variantes de la réaction de Pettenkofer, la plus intéressante dans le cas présent nous a semblé être celle de Herzfeld et Haemmerli, bien qu'à la coloration produite ne corresponde pas de spectre d'absorption permettant le contrôle dont nous avons parlé (p. 119). Pourvu que le temps de chauffage soit convenablement réglé, il ne se manifeste pas, selon ces auteurs, d'intervention fâcheuse « des lipoides, des graisses, des protéines et des hydrates de carbone ». Si ce mode opératoire mérite quelque attention, c'est néanmoins sous réserve d'une vérification, car Herzfeld et Haemmerli ne décrivent pas, dans leur mémoire, les expériences qui les ont conduits à cette constatation. Comme d'autre part nous estimons, avec la plupart des chimistes,

(1) On doit mentionner en outre la méthode de Raue [239], basée sur la fluorescence des sels biliaires en milieu sulfurique.

que la comparaison colorimétrique des solutions bleues ou vertes est plus aisée que celle des solutions jaunes ou orangées, cette variante offrait un nouvel avantage pratique.

Nous envisagerons successivement l'étude de la réaction elle-même, le parti que l'on en peut tirer pour le dosage colorimétrique des sels biliaires, et enfin son utilisation pour l'analyse des biles et des liquides de tubage duodénal.

1^{re} ETUDE QUALITATIVE DE LA RÉACTION

A) *Sensibilité.* — Dans les conditions indiquées par Herzfeld et Haemmerli, nous avons mis en œuvre des quantités variables d'acide glycocholique dissoutes chaque fois dans 1 cm³ d'eau faiblement alcalinisée. Après addition de 0 cm³ 5 de solution alcoolique de furfural à 1 % et de 2 cm³ d'acide phosphorique concentré de Foulenc (renfermant en poids 85, 3 % de PO³H), tous les mélanges ont été chauffés au bain-marie bouillant pendant cinq minutes, puis refroidis. Nous avons noté la série de colorations suivantes :

Avec 1 mg.	d'acide glycocholique,	coloration	bleu forcé.
— 0 mg. 5	— — —	—	bleu-vert.
— 0 mg. 25	— — —	—	vert-bleu.
— 0 mg. 125	— — —	—	vert-grisâtre.
— 0 mg. 0625	— — —	—	vert à peine percept.
— 0 mg. 0312	— — —	—	pas de coloration.

Il apparaît tout d'abord une teinte violet-rose, qui fait place ensuite à la coloration bleue.

Ce sont là les teintes décroissantes observées par Herzfeld et Haemmerli; la réaction limite correspond bien à 0 mg. 0625, soit à une concentration de 1/16.000.

Nous avons fait les mêmes observations en remplaçant l'acide glycocholique par des quantités identiques de taurocholate de soude, puis d'acide cholalique; il était à prévoir que ces trois composés se comporteraient de la même manière, puisque la molécule des acides glycocholique et taurocholique est presque entièrement constituée par le radical cholalique.

On peut remarquer aussi que la sensibilité de la réaction ainsi conduite est plus que suffisante, dans le cas qui nous occupe.

B) *Conditions optima de la réaction.* — a) *Proportion et concentration des réactifs.* — Une première série d'essais nous a montré qu'on ne pouvait augmenter le volume de la solution de furfural sans qu'il se produise, pendant le chauffage, des pertes par projections. En opérant constamment sur un milligramme d'acide cholalique et en utilisant 0 cm³ 5 de solutions de furfural

de concentration variable, nous avons obtenu ces différentes colorations:

Solution de furfural à 10	p. 100, coloration très foncée, presque noire.
— — 5	p. 100, coloration vert-noirâtre.
— — 2,5	p. 100, color. vert foncé, à nuance grisâtre.
— — 1	p. 100, coloration bleu-vert franc.
— — 0,5	p. 100, coloration bleu-vert plus pâle.
— — 0,10	p. 100, coloration bleu-vert pâle.

Toutes choses égales d'ailleurs, c'est donc la solution de furfural à 1 % qui fournit la coloration la plus nette et qui paraît devoir se prêter le mieux à un dosage.

Il est indispensable que l'acide phosphorique possède un titre élevé; avec l'acide officinal à 50 %, il ne se développe aucune coloration, lors même que le temps de chauffage est prolongé (quinze minutes). Nous avons adopté l'acide orthophosphorique de Poulenc, de densité 1,71 à 1,75. Quant au volume d'acide à utiliser, on a avantage à le porter de 2 à 3 cm³ 5; la teinte produite vire légèrement au bleu, tandis que le volume total atteint 5 cm³, ce qui permet d'effectuer le mélange des réactifs dans un tube jaugé à 5 cm³ (1 cm³ de solution biliaire + 0 cm³ 5 de solution de furfural + acide phosphorique, quantité suffisante pour 5 cm³). On introduit ainsi aisément la même quantité d'acide dans tous les essais, ce qui serait impossible à faire en mesurant avec une pipette ce réactif de consistance sirupeuse.

Nous avons vérifié qu'on ne pouvait, comme il était à prévoir, substituer à l'acide phosphorique, ni l'acide acétique, qui est d'ailleurs volatil, ni l'acide lactique, ni une solution très concentrée d'un phosphate acide. Il faut recourir à un acide minéral fort.

b) *Temps de chauffage.* — De tous les modes de chauffage susceptibles d'être employés, le plus commode et le plus aisé à surveiller consiste, sans contredit, à plonger les tubes pendant un temps déterminé dans un bain d'eau bouillante. En effectuant donc la réaction sur 0 mg. 5 d'acide glycocholique et en faisant varier le temps de chauffage de deux à vingt minutes, nous avons noté des colorations d'autant plus intenses que l'action de la chaleur s'était exercée plus longtemps. La sensibilité de la réaction peut donc être accrue, moyennant un chauffage de plus de cinq minutes, mais on risque alors de provoquer, comme on le verra plus loin, la production de teintes parasites.

c) *Spécificité.* — Ne pouvant envisager successivement la part que peuvent prendre, dans la réaction, tous les constituants

éventuels de la bile, nous avons du moins considéré quelques-uns d'entre eux, auxquels on attribue, dans les modes opératoires classiques, une influence fâcheuse. En utilisant comparativement l'acide sulfurique dilué au demi (en volumes) et l'acide phosphorique, nous avons traité, comme il est dit plus haut, des solutions d'hydrates de carbone (glucose), de cholestérol, de lécitine, de savon, d'acides gras et des dilutions de sérum sanguin apportant, avec des protéines, des composés organiques très variés. Voici ce que nous a donné un chauffage de cinq minutes au bain-marie bouillant:

	<i>Avec SO⁴H² au demi</i>	<i>Avec PO⁴H³</i>
Sol. aqueuse de glucose à 1 p. 100	Color. brun clair.	Pas de coloration.
Sol. alcoolique de cholestérol à 0,1 p. 100.	Color. gris-brunâtre.	Coloration grisâtre très faible.
Sol. chloroform. de cholestérol à 0,2 p. 100.	Color. gris-violet.	Coloration grisâtre très faible.
Sol. alcoolique de lécitine à 0,1 p. 100. ..	Color. gris-brunâtre.	Coloration grisâtre très faible.
Sol. alcoolique de savon à 0,2 p. 100	Color. gris-violet.	Color. gris-bleuâtre fugace.
Sol. alcoolique d'acide oléique à 0,1 p. 100.	Color. gris-bleu.	Coloration bleuâtre fugace.
Sol. alcool. d'ac. stéarique à 0,1 p. 100 ..	Color. gris-brunâtre.	Coloration grisâtre très faible.
Sol. alcoolique d'acide palmitique à 0,1 p. 100	Color. gris-brunâtre.	Coloration grisâtre très faible.
Dilution au 1/10 de sérum sanguin	Col. brune assez foncée	Col. jaune à peine perceptible.

La première et la dernière solution ayant été chauffées pendant un temps plus long en présence de furfural et d'acide phosphorique, la solution de glucose n'a légèrement bruni qu'au bout de quinze minutes, tandis que la dilution de sérum s'est nettement colorée en brun. Il est d'ailleurs à noter que les quantités de substances mises en œuvre sont relativement grandes; si l'on opère, par exemple, sur 0 cm³ 2 de bile (et c'est sur cette prise d'essai que portera notre technique), il faudra, pour que se développent ces faibles teintes grisâtres, que la bile renferme 5 gr par litre des composés envisagés.

Il apparaît toutefois que l'acide oléique et les oléates fournissent une coloration bleue plus ou moins analogue à celle que donnent les sels biliaires; nous avons donc répété l'expérience avec 10 milligrammes de cet acide et obtenu une teinte bleue très nette, que nous avons cherché à reproduire en utilisant une dose convenable d'acide cholalique. Il nous a fallu environ 40 fois plus

d'acide oléique que d'acide cholalique. On ne peut guère apprécier, *a priori*, l'importance de l'erreur que fera commettre la présence d'acide oléique dans des échantillons analysés. En ce qui concerne l'acide oléique combiné à l'acide désoxycholique pour former l'acide cholénique, on peut se faire une idée de l'erreur par excès ainsi causée. Si l'on suppose même qu'il n'existe pas d'autre acide gras et que l'acide désoxycholique ne se trouve associé qu'au seul acide oléique, dans la proportion (indiquée par Wieland et Sorge) de 8 molécules du premier pour une molécule du second, on calcule qu'il faudrait environ 500 mg d'acide oléo-cholénique pour que prenne naissance, du fait de l'acide oléique ainsi combiné, la coloration bleue qui correspond à 1 milligramme d'acide cholalique. Quant à l'erreur provoquée par les savons oléiques que renferme la bile, c'est l'expérience qui permettra d'en juger, car la teneur de la bile en savons (qui n'a pas été déterminée jusqu'à présent dans le liquide duodénal), semble varier dans des limites très larges (p. 31 et suiv.); nous reviendrons sur ce point ultérieurement.

A ces observations s'ajoutent celles que nous avons faites sur le comportement de la bilirubine, grâce à l'obligeance de M. le Professeur P. Fleury. Avec 0 mg. 05 de ce pigment, dissous dans la soude décijnormale, il s'est développé une coloration rose, virant ensuite au violet pâle. En milieu sulfurique, c'est une teinte verte qui apparaît, comme dans la recherche classique des pigments.

D'une manière générale, la substitution de l'acide phosphorique à l'acide sulfurique est avantageuse, puisque, grâce à elle, l'intervention des substances parasites est pratiquement évitée.

D) *Comportement des sels biliars dérivant d'autres acides que l'acide cholalique.* — Les expériences que nous avons décrites page 125 font voir que la réaction de Pettenkofer et ses variantes (parmi lesquelles celle d'Herzfeld et Haemmerli) décèlent surtout les sels biliars de la série cholalique. Comme ces derniers prédominent nettement dans la bile humaine, l'emploi de ces réactions reste légitime, pourvu qu'en les faisant servir à des estimations quantitatives, on n'exige pas de celles-ci une rigoureuse précision. Aussi bien, les examens comparatifs, dont on trouvera les résultats à la fin de ce chapitre, montrent que notre méthode colorimétrique donne sensiblement les mêmes chiffres que la méthode gazométrique, laquelle dose évidemment tout l'azote aminé engagé dans la molécule des acides biliars.

E) *Comportement des sels biliaires en solution alcoolique.* — En prévision d'une désalbumination préalable de la bile par l'alcool, il convenait de vérifier que les solutions alcooliques de sels biliaires se comportaient, dans la réaction utilisée, exactement de la même façon qu'en solution aqueuse. C'est ce que nous avons constaté en dissolvant les mêmes quantités de glycocholate, de taurocholate et de cholate de soude, soit dans l'eau, soit dans l'alcool à 80° ou à 95°. La nature du solvant s'est montrée sans influence et les observations précédentes, qui ont été faites sur des solutions aqueuses de sels biliaires, s'appliqueront également à des dilutions alcooliques de bile.

F) *Action de divers solvants sur la matière colorante.* — Une solution colorée renfermant ainsi, en volume, 70 " d'acide phosphorique sirupeux se prête mal aux comparaisons colorimétriques. Il est nécessaire de la diluer de son volume (5 cm³) d'un liquide approprié. Nous avons employé tout d'abord l'eau distillée qui a en effet rendu possibles nos premiers essais quantitatifs, mais à la condition que les lectures soient faites sans délai. La matière colorante ne reste pas dissoute, mais se rassemble en flocons noirâtres, et d'autant plus rapidement qu'elle est plus abondante. Cette floculation ne se produit pas si l'on dilue la solution colorée avec de l'acétone ou de l'alcool, ce qui provoque un faible dégagement de chaleur accompagné d'une contraction; aussi avons-nous adopté l'alcool à 50 ". Ayant eu recours par la suite, comme on le verra, à une détéction de la bile par une solution alcoolique d'acétate de plomb, nous avons pu observer que l'acide acétique cristallisable, non seulement s'opposait à la précipitation du phosphate de plomb, mais fournissait en outre des solutions colorées d'une teinte bleue plus franche et beaucoup plus stable qu'en milieu alcoolique. Comme il se produit alors dans tous les tubes une même contraction, l'intensité relative des teintes ne s'en trouve aucunement modifiée.

G) *Influence de quelques réactifs.* — Nous signalerons seulement ici que l'acétate de plomb n'exerce aucune influence sur le développement de la coloration bleue. Quant au cyanure de mercure, que nous avons cru pouvoir utiliser pour conserver les échantillons de bile, il a suffi d'en introduire dans une solution de taurocholate de soude pour observer son action empêchante.

2° ETUDE QUANTITATIVE DE LA RÉACTION

Il existe plusieurs manières de faire servir une telle réaction à des déterminations quantitatives. On peut, avec Herzfeld et Haemmerli, employer la méthode de la réaction-limite, qui ne demande sans doute qu'un matériel rudimentaire, mais comporte une telle imprécision qu'on ne saurait s'en contenter. Les résultats seront un peu plus exacts si l'on compare les teintes fournies par les biles examinées avec celles d'une gamme colorée, préparée en effectuant la réaction sur des quantités régulièrement croissantes de sels biliaries. Pour n'être pas d'une application fastidieuse, une semblable méthode exige que les colorations de la gamme restent inchangées, au moins pendant quelques semaines par exemple. Or, ce n'est pas le cas, même lorsqu'on utilise l'acide acétique pour diluer finalement les mélanges colorés. D'autre part, et quoique le choix de cet acide se montre nettement avantageux, la nuance des teintes est trop complexe pour qu'il soit possible de construire, ainsi que nous avons cherché à le faire, une échelle artificielle, stable. Aucun colorant organique, ni aucun sel minéral, ne s'est montré convenable; après maints tâtonnements, nous sommes seulement parvenu à reproduire les différentes teintes observées, en mélangeant dans certaines proportions des solutions de sulfate de cuivre, de permanganate de potasse et de perchlorure de fer. Il ne semble pas intéressant de recourir à un mode opératoire aussi peu pratique pour n'aboutir en définitive qu'à des valeurs assez approximatives.

Ce n'est qu'à l'aide du colorimètre que l'on pourra effectuer correctement les comparaisons; on n'aura plus alors à compter, comme dans les autres dosages colorimétriques, qu'avec l'équation personnelle de l'opérateur.

Examen de solutions titrées d'acides et sels biliaries. — Tous ces essais ont été conduits pareillement. Dans un tube jaugé à 5 cm³ et 10 cm³, nous avons mesuré 1 cm³ de la solution étudiée, 0 cm³ 5 d'une solution alcoolique de furfural à 1 % et de l'acide phosphorique concentré, quantité suffisante pour 5 cm³; après une agitation énergique, le tube a été plongé pendant 5 minutes dans un bain d'eau bouillante, puis dans un bain d'eau froide pendant cinq autres minutes. Nous avons ajouté ensuite, jusqu'au second trait de jauge un liquide de dilution qui, comme on l'a vu, fut tout d'abord l'eau distillée, puis l'alcool à 50°, et enfin l'acide acétique cristallisable. Une fois le mélange effectué, l'intensité de la coloration produite a été comparée au colorimètre avec

celle d'un étalon préparé simultanément en opérant sur une solution d'acide ou de sel biliaire de même concentration ou d'une concentration voisine.

Pour simplifier cet exposé, nous avons rassemblé dans le tableau suivant les résultats obtenus, en indiquant successivement la nature du produit mis en œuvre, le solvant utilisé, le liquide de dilution adopté, la nature et la quantité du composé ayant fourni la coloration étalon, les quantités de produit introduites et retrouvées, et enfin l'erreur commise pour 100.

NATURE DU PRODUIT	SOLVANT	LIQUIDE DE DILUTION	COMPOSÉ ÉTALON	QUANTITÉ ÉTALON en milligrammes	QUANTITÉ INTRODUITE en milligrammes	QUANTITÉ RETROUVÉE en milligrammes	ERREUR P. 100
Acide glycocholique	Alcool	Eau	Acide glycocholique	2.00	2.00	2.10	+ 5
id.	id.	id.	id.	1.00	1.00	0.99	- 1
id.	NaOH N/10	Alcool à 50°	id.	0.50	0.50	0.48	- 4
id.	id.	id.	id.	0.25	0.25	0.26	+ 4
id.	Alcool	id.	Acide cholalique	2.00	2.00	2.08	+ 4
id.	id.	id.	id.	1.00	1.00	0.96	- 4
id.	id.	Acide acétique	id.	1.00	0.75	0.75	0
id.	id.	id.	id.	0.50	0.40	0.41	+ 2.5
id.	id.	id.	id.	0.25	0.30	0.31	+ 3.3
Taurocholate	Eau	Eau	Taurocholate	2.00	2.00	1.95	- 2.5
id.	Alcool	Alcool à 50°	id.	1.00	1.00	0.97	- 3.0
id.	id.	id.	id.	0.50	0.50	0.53	+ 6.0
id.	id.	id.	Acide cholalique	2.00	2.00	1.92	- 4.0
id.	id.	id.	id.	1.00	1.00	0.99	- 1
id.	id.	Acide acétique	Taurocholate	1.00	1.00	1.02	+ 2
id.	id.	id.	id.	1.00	0.75	0.75	0
id.	id.	id.	Acide cholalique	0.50	0.40	0.39	- 2.5
Acide cholalique	Alcool	Alcool à 50°	Acide cholalique	1.00	1.00	1.02	+ 2
id.	NaOH N/10	id.	id.	0.75	0.75	0.73	- 2.6
id.	Alcool	id.	id.	0.50	0.50	0.51	+ 2
id.	id.	Acide acétique	id.	1.00	0.80	0.81	+ 1.2
id.	id.	id.	id.	0.50	0.40	0.39	- 2.5
id.	id.	id.	id.	0.25	0.20	0.20	0

Ces chiffres montrent bien que le dosage colorimétrique des sels biliaires purs est parfaitement réalisable, pourvu que la concentration de l'étalon soit voisine de celle de la solution examinée; si cette dernière concentration subit de grandes variations, et atteint des valeurs que l'on ne puisse prévoir, il faudra disposer d'un certain nombre d'étalons, ainsi d'ailleurs que pour la plupart des dosages colorimétriques. Nous avons cherché à n'utiliser qu'un seul étalon, auquel seraient comparées les teintes fournies par des quantités de sels biliaires très différentes, alors même que la formule de Beer ne s'appliquerait plus; il suffirait pour cela de tracer une courbe ou d'en établir la formule algébrique, comme l'ont fait par exemple Delaville et Jones [76] pour le dosage de l'acide urique. Mais les colorations données par la réaction utilisée ici ne sont pas tout à fait également bleues, même en milieu acétique, lorsque la dose de sel biliaire se trouve modifiée; plus cette dose est faible, plus la teinte bleue produite tire sur le vert, et devient difficilement comparable à celle d'un étalon unique, de nuance franchement bleue; il est donc nécessaire de recourir à un étalon moins coloré.

Lorsque, dans les expériences qui précèdent, le dosage a porté sur un acide ou sur un sel biliaire, alors que l'étalon était préparé avec de l'acide cholalique, les valeurs trouvées ont été multipliées par les coefficients de transformation théoriques: 1,139 pour l'acide glycocholique et 1,316 pour le taurocholate. L'emploi de solutions étalons d'acide cholalique devra être conservé pour l'analyse des biles, car on n'a pas à faire de distinction, jusqu'à présent, entre les divers acides biliaires, et il convient de doser l'élément qui leur est commun, à savoir l'acide cholalique. Au surplus, cet acide semble être le seul composé de ce groupe que l'on trouve dans le commerce à un état de pureté satisfaisant. Les solutions alcooliques se conservent sans altération, car nous en avons mis en œuvre qui étaient âgées de plus d'un an sans qu'elles se comportent autrement que des solutions récentes. Nous n'avons pas noté non plus de différences sensibles en utilisant des solutions aqueuses de cholalate de soude, additionnées, au moment de leur préparation, de quelques gouttes de toluène.

3° APPLICATION DE CETTE MÉTHODE A L'ANALYSE DE LA BILE ET DU LIQUIDE DUODÉNAL

On ne saurait évidemment assimiler les dilutions de bile aux solutions pures de sels biliaires examinées plus haut. Elles doivent être purifiées moyennant un traitement préalable qui, étant donné

le but poursuivi, devra être lui-même aussi simple que possible. Ce traitement peut être conduit de deux façons différentes: ou bien les sels biliaires seront extraits quantitativement, puis dosés, ou bien les substances gênantes qui les accompagnent seront éliminées. La première méthode est la plus séduisante, mais ne se montre pas applicable.

1) *Essais d'extraction des sels biliaires*

Il serait illusoire de chercher à faire cristalliser la totalité des acides biliaires dans un milieu aussi complexe que la bile, et surtout que le liquide duodénal, dont la teneur en sels est parfois très faible. Ces acides ne sont rigoureusement insolubles dans aucune condition. On ne peut davantage les précipiter intégralement par un sel métallique (de plomb, de fer, etc), car un excès de réactif redissout alors le précipité; ce dernier entraîne d'ailleurs les pigments. Le seul procédé à retenir consiste à épuiser les biles à l'aide d'un solvant qui enlève les sels à doser, en laissant les autres constituants biliaires.

Pour extraire ces sels d'une solution aqueuse, il est logique d'acidifier cette dernière, puisque les acides biliaires sont moins solubles dans l'eau que leurs sels alcalins. Les dissolvants usuels essayés ont été l'éther, le chloroforme, l'éther acétique, le benzène et le tétrachlorure de carbone. Si l'on agite à plusieurs reprises, avec un fort volume de l'un de ces liquides, une solution aqueuse de glycocholate de soude acidifiée par l'acide chlorhydrique, on constate qu'une faible proportion d'acide biliaire se trouve ainsi soustraite à la solution aqueuse. Pour avoir une extraction complète, il faudrait, soit répéter les traitements par le solvant adopté, ce qui obligerait à en distiller finalement un volume assez considérable, soit pratiquer un épuisement continu dans un perforateur tel que celui de Fayolle et Lormand. Chaque dosage immobiliserait alors un appareil et deviendrait fort long. Si l'on songe, en outre, que ces mêmes solvants entraînent, avec les acides biliaires, la plupart des substances qu'il s'agit précisément d'éliminer (cholestérol, acides gras, etc.), on est amené à renoncer à un semblable traitement (1).

(1) C'est une sorte d'isolement des sels biliaires que réalise la technique de Meillère, dont on peut ici supprimer le premier stade (saturation par le sulfate d'ammoniaque). La solution alcoolique renfermant les sels biliaires est évaporée après addition de quelques grammes de charbon animal, puis le résidu lavé est épuisé par l'alcool. Une nouvelle évaporation fournit les sels biliaires à un état de pureté sensiblement satisfaisant. Nous avons obtenu, en opérant ainsi, des résultats assez bons, mais parfois irréguliers; cette façon de procéder ne se prête pas très bien à des dosages en série.

Nous nous sommes toutefois demandé si, en présence de sulfate de soude anhydre, les sels biliaires ne se laisseraient pas extraire plus aisément de leur solution aqueuse, du fait que disparaîtrait, pendant l'hydratation du sulfate, le véhicule qui les retient. Des essais ont ainsi porté sur des solutions de glycocholate et sur des extraits alcooliques de bile redissous dans l'eau. Quel que soit le solvant employé, les résultats ont été négatifs; comme permettaient de le prévoir les expériences de Meillère, les sels biliaires sont restés fixés sur le sulfate de soude. D'autres tentatives, également infructueuses, ont en outre été faites, qui mettaient à profit, selon les indications de Vitali [298], les solubilités des sels de quinine des acides biliaires. C'était même introduire un nouvel élément, à savoir la quinine. La même objection empêche d'accroître, par addition de phénol ou de thymol, le pouvoir dissolvant des liquides organiques cités plus haut, car ces composés interviennent, comme on le sait, dans la réaction de Pettenkofer. L'extraction des sels biliaires ne semblant pas être pratiquement possible, c'est à la seconde méthode que l'on doit recourir.

2) Purification des solutions étudiées

Ce traitement consistera à éliminer les protéines, les pigments, et s'il y a lieu les matières grasses, lipoidiques, etc.

A. Elimination des protéines et des mucines

Si l'on cherche à effectuer la réaction sur une simple dilution aqueuse de bile, il apparaît un trouble qui fausse complètement les lectures colorimétriques et qui est dû à la présence dans la bile de substances protéiques, et surtout de mucines; de même que pour les dosages gazométriques, l'addition d'un volume suffisant d'alcool fort les élimine aisément, tandis que les sels biliaires restent en solution. Pour éviter, dans le cas des liquides duodénaux, une trop grande dilution, nous avons adopté, après quelques tâtonnements, les proportions de quatre volumes d'alcool à 95 pour un volume de bile, cette dernière se trouvant ainsi diluée au 1/5. Les biles vésiculaires, toujours très riches en sels biliaires, seront beaucoup plus fortement diluées, au 1/100 par exemple. De toute manière, cette précipitation par l'alcool peut être faite, soit en portant les mélanges à l'ébullition, soit en les abandonnant pendant une douzaine d'heures à la température du laboratoire. Lorsqu'on opère à chaud, le précipité protéique se rassemble aussitôt en grumeaux et l'on rétablit le volume primitif, en

ajoutant un peu d'alcool. Ce précipité ne retient pas de sels biliaires, ainsi que nous nous en sommes assuré en introduisant, dans des solutions aqueuses de glycocholate ou de taurocholate de soude, soit des albumines sériques, soit de la mucine fournie par des crachats très muqueux, et en quantité telle que les précipités produits sont au moins aussi abondants que lors de la défécation par l'alcool, des biles et des liquides duodénaux. Nous avons obtenu, d'autre part, les mêmes résultats, que le coagulum soit ou non lavé sur le filtre avec de l'alcool chaud (taurocholate: 8,36 et 8,35).

B. *Elimination des pigments biliaires*

Après avoir tout d'abord pensé que ce traitement par l'alcool serait suffisant, nous avons constaté que, quand les sels biliaires sont peu abondants, la teinte surajoutée par les pigments rend très pénible l'examen colorimétrique. Un opérateur exercé parvient sans doute à retrouver sensiblement les acides biliaires introduits dans une solution de bilirubine, ou dans des filtrats fortement pigmentés. Les chiffres suivants le montrent bien:

Acide cholalique ajouté	2 mg.	Trouvé . . .	1 mg. 94
— glycocholique ajouté.	1 mg.	Trouvé . . .	1 mg. 04
— — — ajouté.	0 mg. 50	Trouvé . . .	0 mg. 48

Mais en effectuant, à l'hôpital, d'assez nombreuses analyses de liquide de tubage, nous avons dû cependant modifier la technique, de façon à opérer sur des solutions aussi peu colorées que possible.

a) *Essais de décoloration par le charbon.* — L'emploi d'un noir décolorant vient aussitôt à l'esprit, mais ne peut être adopté sans contrôle, depuis que Meillère a montré la facilité avec laquelle les sels biliaires sont fixés par le noir animal.

a) *En milieu aqueux*, cette adsorption des sels biliaires est complète. Ayant ajouté par exemple, à 5 cm³ d'une solution aqueuse de glycocholate à 1 p. 1.000, 0 gr. 10 de noir animal, nous avons chauffé le mélange au bain-marie pendant trois minutes et filtré après refroidissement. Le filtrat ne renfermait plus la moindre trace de sel biliaire.

b) *En milieu alcoolique*, cette fixation se manifeste moins nettement et d'une manière irrégulière. Ayant traité, par 0 gr. 10 de ce même noir, 10 cm³ d'une solution de taurocholate à 2 ‰ dans l'alcool à 90°, nous n'avons pas observé, après chauffage,

refroidissement et filtration, de perte appréciable en sel biliaire, mais ce résultat encourageant n'a pas été retrouvé lorsque nous avons voulu décolorer ainsi 5 cm³ d'un filtrat alcoolique provenant d'une bile B très pigmentée. Dans des essais comparatifs, utilisant également 0 gr. 10 de charbon, mais avec des temps de contact variables, nous avons noté les chiffres suivants :

Filtration après 5 min. de contact	1.66 (ar. cholalique)
— — 10 min. de contact	1.60
— — 30 min. de contact	2.00
— — 15 min. de contact, puis chauff. à l'ébullition ..	1.81
— — 30 min. de contact, puis chauff. à l'ébullition ..	1.81
Témoin sans noir animal	2.22

Tous les dosages faits après décoloration par le charbon fournissent donc des valeurs inférieures à celles du dosage témoin, mais les écarts sont irréguliers. Il s'agit vraisemblablement de deux actions antagonistes, qui s'exercent plus ou moins rapidement et qui sont, d'une part, la fixation des sels biliaires par le charbon, et, d'autre part, leur redissolution par l'alcool.

En décolorant ensuite quelques filtrats très pauvres en sels biliaires, nous avons vu ces derniers disparaître presque entièrement.

·) *Comparaison du pouvoir absorbant de plusieurs charbons.* — Aldrich et Bledsøe décolorent cependant de tels filtrats par le noir « norite », en recommandant d'en employer une dose convenable, car, disent-ils, un excès de charbon provoque une perte en sels biliaires allant de 2 à 10 %. Cette dose est fixée à 0 gr. 05 de norite pour 35 cm³ de dilution alcoolique de bile à 1/200, ayant un titre alcoolique voisin de 95°. Etant en définitive des dilutions de liquide duodénal au 1/5, nos filtrats ne possèdent qu'un titre moins élevé (80°), plus favorable encore à la fixation des sels biliaires par le noir. Pour décolorer sensiblement, moyennant un contact de quinze minutes, 10 cm³ d'une telle dilution fortement pigmentée, nous avons dû mettre en œuvre 0 gr. 10 de noir « norite » de Poulenc. Un même filtrat riche en pigments ayant été divisé en trois fractions de 10 cm³, nous avons ajouté à la première 0 gr. 10 de « noir animal lavé » de Billault, à la seconde 0 gr. 10 de « charbon activé » de Poulenc très finement pulvérisé au préalable, et à la troisième 0 gr. 10 de noir « norite » ; après un quart d'heure de contact et d'agitation, les deux premiers filtrats renfermaient encore beaucoup de pigments, tandis que le troisième était sensiblement incolore. Les trois do-

sages ont fourni le même chiffre de 6,25 d'acide cholalique par litre de bile; le noir « norite » a donc montré un pouvoir décolorant bien supérieur à celui des autres produits essayés, sans retenir davantage de sels biliaires. Mais en répétant cette expérience sur une bile moins concentrée, nous avons obtenu ces valeurs:

Sans décoloration	3.00
Après traitement par le noir animal	2.78
— — par le charbon activé	2.80
— — par la norite	2.58

Ces différences s'expliquent-elles par une élimination plus ou moins parfaite des substances parasites, ou par une adsorption des sels biliaires d'autant plus marquée que leur taux est moins élevé ? Pour nous en rendre compte, nous avons fait agir les mêmes produits sur différentes solutions de glycocholate dans l'alcool à 80°, ce qui nous a donné ces résultats:

Solution de glycocholate à	4 gr. 40	à 2 gr. 20	à 1 gr. 10 (p. 1000)	
Témoin sans noir	4 gr. 35	2 gr. 20	1 gr. 10	—
Après action du noir animal	4 gr. 35	2 gr. 20	1 gr. 05	—
— — du charbon activé...	4 gr. 25	2 gr. 10	1 gr. 03	—
— — de la norite	4 gr. 15	1 gr. 85	0 gr. 80	—

L'importance de la perte en sel biliaire est ainsi inversement proportionnelle à la concentration de la solution, ce qui rend dangereux l'emploi de norite pour décolorer les filtrats des biles A et C de tubage duodénal. Comme il est impossible d'apprécier la dose de noir nécessaire, pour la réduire en conséquence, ce mode de traitement doit être abandonné; de plus, le pouvoir adsorbant et décolorant ne saurait être le même pour tous les échantillons de noir, ces derniers fussent-ils de la même marque.

b) *Essais de décoloration par voie chimique.* — Sans attendre beaucoup de cette façon de procéder, nous avons cherché à détruire les pigments par un réactif approprié, ou du moins à les transformer en substances inactives.

a) *Hypochlorites.* — En effectuant la réaction sur 1 milligramme d'acide cholalique dissous dans l'alcool, nous avons observé que l'addition d'une goutte d'extrait de Javel retardait nettement le développement de la coloration bleue, dont l'intensité était également réduite; il en est de même avec le taurocholate de soude; et enfin, un filtrat alcoolique de bile décoloré par l'hypochlorite a conduit à un chiffre de 3,50 par litre, alors qu'un dosage

témoin indiquait 4 grammes. Cette différence eût pu s'expliquer précisément par l'élimination des pigments si les teintes produites dans les deux dosages n'avaient été également grisâtres. L'hypochlorite fut alors dilué au 1/10 et associé à une goutte d'acide phosphorique, les mélanges étant ici légèrement chauffés pour chasser la majeure partie du réactif oxydant; dans ces conditions, nous n'avons plus constaté de perturbations, mais les lectures colorimétriques ne se sont trouvées aucunement facilitées. Les pigments disparaissent rapidement, mais les dérivés incolores qui les remplacent se comportent à peu près de la même manière dans la réaction d'Herzfeld.

β) *Eau oxygénée*. — Ce réactif présente sur les hypochlorites cet avantage de se laisser complètement éliminer par simple évaporation. Ce n'est qu'à chaud qu'il décolore plus ou moins la bile, en donnant tout d'abord avec les pigments la réaction d'oxydation classique (coloration verte); on pourra donc évaporer les filtrats biliaires et traiter le résidu par l'eau oxygénée à la température du bain-marie. Nous avons par conséquent fait agir, sur 5 milligrammes d'acide cholalique, 5 cm³ d'eau oxygénée à dix volumes (dilution de perhydrol) et repris par l'alcool le résidu d'évaporation; la réaction colorée étant effectuée comparative-ment sur une portion de cette solution alcoolique et sur une solution témoin d'acide cholalique, nous avons observé que la coloration produite, après intervention de l'eau oxygénée, était beaucoup moins intense que dans la réaction témoin. D'autres essais analogues ont fourni le même résultat et montré que l'eau oxygénée fait subir à l'acide cholalique quelque modification assez profonde, qui peut sans doute être rapprochée des diverses oxydations dont l'étude chimique des acides biliaires a déjà tiré parti; cette hypothèse est également vraisemblable, en ce qui concerne l'influence de l'hypochlorite.

c) *Elimination des pigments par précipitation*. — α) *Défecation barytique*. — La précipitation des pigments sous forme de combinaisons barytiques insolubles est mise à profit dans la méthode classique qu'a indiquée M. Grimbert pour la recherche de ces pigments dans l'urine. Les sels de baryum des acides biliaires étant, au contraire, solubles dans l'eau et dans l'alcool, nous avons tenté de les séparer ainsi des pigments. Or, cette précipitation ne peut être faite dans les filtrats alcooliques de bile, qui renferment environ 80 % d'alcool, et qu'un contact prolongé (une nuit) avec du chlorure de baryum ou avec de la baryte ne

suffit pas à décolorer; l'alcool maintient les pigments en solution, surtout en présence de chlorure de baryum. C'est donc sur la bile elle-même que doit porter la défécation, pour laquelle un mélange à volumes égaux d'une solution à 1/10 de chlorure de baryum et d'une solution N 10 de baryte s'est montré préférable à chacune de ces deux solutions employée isolément; le précipité floconneux qui prend naissance est alors surmonté d'un liquide incolore, mais la majeure partie des sels biliaires reste fixée sur le précipité, ainsi qu'il était à craindre.

β) *Défécation mercurique.* — Renonçant donc à cette méthode, nous avons essayé d'éliminer les pigments à l'état de sels mercuriques, dont la formation est admise par von Ettingen et Sollmann, dans la réaction au sublimé [214]. Le précipité prend l'état colloïdal et traverse tous les filtres; de plus, il faut ici, pour éviter la production de phosphate mercurique, se débarrasser de l'excès de sublimé, en s'exposant à une nouvelle adsorption des sels biliaires.

γ) *Défécation plombique.* — Nous avons enfin étudié un nouveau mode de défécation qui s'est montré, sinon parfait, du moins pratiquement satisfaisant. Il repose sur cette observation que, si l'on ajoute à la bile une solution alcoolique d'acétate de plomb, on obtient, après filtration, un liquide pour ainsi dire exempt de pigments, lorsque la bile elle-même n'est pas trop colorée; lorsqu'elle l'est, au contraire, intensément, les pigments ne sont pas totalement précipités, mais la coloration plus ou moins jaune du filtrat peut être négligée, puisqu'elle s'accompagne, dans ce cas, d'une forte teneur en sels biliaires. Les mucines, etc., se trouvent coagulées par l'alcool et précipitées par l'acétate de plomb, tandis que ce dernier insolubilise les pigments, avec certains sels minéraux (sulfates, carbonates, phosphates). Les sels de plomb des acides biliaires étant solubles dans l'alcool, on les retrouvera dans le filtrat, pourvu qu'ils ne soient pas adsorbés, dans une mesure appréciable, par le précipité. Afin d'élucider ce point essentiel, il convenait de préciser les conditions de cette défécation et de s'assurer que le dosage colorimétrique restait praticable.

1. Lorsqu'on conserve les proportions habituelles de bile (1 volume) et d'alcool (4 volumes), mais en dissolvant préalablement dans l'alcool de 0 gr. 50 à 5 gr. % d'acétate neutre de plomb, c'est le plus souvent avec la solution à 2 % que l'on obtient la meilleure décoloration. L'examen des biles A et C, parfois im-

possible à faire après défécation par l'alcool seul, porte alors sur des liquides qui ne retiennent plus que des traces de pigments; quant aux biles B plus pigmentées, elles fournissent des filtrats beaucoup moins colorés qu'après cette dernière défécation.

2° Il en est de même si l'on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque ou d'acide acétique; lorsqu'on acidifie par l'acide acétique la solution d'acétate, afin d'en faciliter la conservation, la décoloration s'effectue moins bien.

3° Lorsque les mélanges sont abandonnés pendant une nuit, les filtrats sont nettement plus colorés que lorsque la filtration est pratiquée aussitôt; il semble qu'un contact prolongé du précipité avec l'alcool provoque la redissolution des pigments.

4° La réaction d'Herzfeld-Haemmerli étant faite, comme il a été dit, sur 1 cm³ d'un filtrat ainsi obtenu, on observe que l'acide phosphorique donne un précipité blanc de phosphate de plomb, qui se dissout dès que le tube est plongé dans l'eau bouillante, et qui ne se reforme pas pendant le refroidissement. Mais l'addition au mélange de son volume d'alcool à 50 % fait reparaitre ce précipité, qui empêche absolument toute comparaison colorimétrique. C'est pourquoi nous avons été amené à employer pour cette dilution finale l'acide acétique après avoir essayé divers liquides et noté, avec les teintes produites, l'aspect des mélanges au bout de quinze minutes (en opérant chaque fois sur 1 cm³ d'une solution d'acide cholalique à 0,10 %, dans l'alcool à 95° renfermant en outre 2 % d'acétate de plomb):

<i>Liquide de dilution</i>	<i>Teinte produite</i>	<i>Aspect du mélange</i>
Eau distillée	Gris-vert sale.	Louche.
Sol. aqueuse d'ac. acét. à 25 p. 100	Verte.	Louche.
— — 50 —	Verte.	Louche.
— — 75 —	Bleu-verdâtre.	Faiblement louche.
Acide acétique cristallisable	Bleue franche.	Limpide.
Acide acétique - alcool à 95° V. E. ..	Bleu-verdâtre.	Trouble.
— — - acétone V. E.	Bleu-vert.	Trouble.
Alcool à 50°	Verte.	Trouble.

Ce n'est donc qu'avec l'acide acétique que la coloration est franchement bleue et que le phosphate de plomb reste dissous.

5° La présence d'un sel de plomb ne trouble aucunement la réaction; si l'on défèque ainsi 1 volume de bile par 4 volumes d'alcool plombique à 2 % d'acétate, le mélange renferme 1.6 p. 100

de ce dernier sel, dont une certaine quantité sera consommée dans la précipitation et ne se retrouvera pas dans le filtrat; ce taux de 1,6 % est donc un maximum, qui ne sera pas atteint dans la pratique, mais que l'on peut envisager dans ces essais. Ceux-ci consistent à introduire une telle dose d'acétate dans des solutions d'acide biliaire et à comparer les chiffres obtenus avec ceux que donnent les mêmes solutions exemptes de plomb. Les chiffres ont été identiques dans ces dosages portant sur des solutions qui contenaient respectivement, par litre, 2 grammes, 1 gramme, 0 gr. 50 et 0 gr. 25 d'acide cholalique.

6° Ces expériences permettent de chercher la réponse à cette question primordiale: Que deviennent les sels biliaires pendant une semblable défécation? Il est difficile d'instituer ici la série d'essais la plus démonstrative, en déféquant ainsi des mélanges de sels biliaires et de protéines en proportion déterminée; avec des solutions de glycocholate additionnées de sérum sanguin, les précipités ne flocculent pas parfaitement. Les mucines se laissent par contre aisément éliminer, mais sont d'un emploi moins commode. Nous avons toutefois examiné des solutions de glycocholate avant et après introduction de mucine de crachats, et réuni ces résultats (exprimés en acide cholalique) :

Témoin	1,20	0,75	0,56
Solution avec mucine	1,20	0,73	0,55

Le précipité donné par la mucine n'a donc pas entraîné une dose notable de glycocholate.

Nous avons, d'autre part, pratiqué d'assez nombreux examens de bile, en déféquant simultanément chacune d'elles par l'alcool à 95° et par l'alcool contenant 2 % d'acétate de plomb. C'est surtout avec les biles de faible teneur en sels biliaires que nous avons constaté l'avantage du nouveau mode de défécation. Les colorations produites sont alors nettement plus franches, sans nuance grise gênante, et beaucoup plus aisément comparables à celles des solutions étalons. Aux chiffres ainsi fournis par des liquides duodénaux, nous avons joint ceux qu'ont donnés quelques biles animales (vésiculaires), pour lesquelles la défécation plombique n'est d'ailleurs pas indispensable, car leurs dilutions au centième sont à la fois sensiblement incolores et riches encore en sels biliaires:

	<i>Défécation par l'alcool</i>	<i>Défécation par l'alcool plombique</i>
Bœuf	56.50	55.50
Veau	42.00	41.50
Mouton	44.00	44.00
Boul. A.	1.32	1.35
Boul. B.	5.55	5.55
Boul. C.	4.54	4.26
Alt. A.	1.50	1.49
Mélange de biles	2.03	1.98
Bile d'autopsie	3.50	3.50
Bail A.	0.93	0.93
Bail B.	8.33	8.00
Bail C.	5.43	5.43
Gib. A.	0.78	0.75
Gib. B.	10.00	10.00
Gib. C.	1.48	1.53
Pasq. A.	5.85	5.85
Pasq. B.	6.50	6.25
Pasq. C.	1.36	1.25
Faur. A.	3.30	3.16
Faur. B.	3.55	3.75
Faur. C.	2.80	3.00
Mart. mélange	7.85	6.95
Martin mélange	2.78	2.78
Cord. A.	1.38	1.35
Cord. B.	16.15	15.85
Cord. C.	0.54	0.50
Rop. B.	10.00	9.84
Rop. C.	1.15	1.09
Cham. B.	20.40	20.00
Cham. C.	0.93	0.90
Lep. A.	2.47	2.50
Lep. B.	11.10	10.40
Lep. C.	1.55	1.53

Cette double série de chiffres montre que la défécation plombique conduit sensiblement aux mêmes résultats que la défécation par l'alcool seul, avec toutefois, pour beaucoup de biles, une légère différence en moins. Il semble que des traces de sels biliaires aient été retenues par le précipité formé, mais peut-être ces écarts, qui sont d'ailleurs de l'ordre de grandeur des erreurs d'expérience, proviennent-ils précisément de l'élimination des pigments; la teinte grisâtre, que ces derniers développent et qui rend parfois si difficile la comparaison colorimétrique, doit en effet faire commettre, dans les cas les plus favorables, une erreur par excès.

7° Les solutions alcooliques d'acétate de plomb à 2 % ne sont pas d'un emploi très commode, car elles ne tardent pas à laisser cristalliser l'acétate; nous avons essayé de substituer à l'alcool éthylique l'alcool méthylique, dans lequel la solubilité de ce sel est plus grande, et qui dissout également les sels de plomb des acides biliaires. Les comparaisons colorimétriques sont devenues impossibles à faire, pour cette raison que tous les échantillons d'al-

cool méthylique que nous avons eus entre les mains donnaient, avec le furfural et l'acide phosphorique, des colorations plus ou moins intenses, allant du gris au rose foncé. Sans chercher à identifier l'impureté en cause, qu'il serait sans doute assez fastidieux d'éliminer, nous avons essayé une autre modification.

A la solution alcoolique d'acétate, nous avons substitué une solution aqueuse à 25 %; à 5 cm³ de bile, nous ajoutons 0 cm³ 5 de cette solution, puis de l'alcool à 95", quantité suffisante pour 10 cm³ et obtenons ainsi des mélanges de même composition, à très peu de chose près, que précédemment. Les filtrats étaient identiques à ceux que fournissait la défécation directe à l'alcool plombique; les exemples suivants font voir qu'il en est pratiquement ainsi des résultats:

	<i>Alcool plombique</i>	<i>Solution aqueuse puis alcool</i>
Fleu. 1	10.99	10.99
Ha. A	4.71	4.46
Ha. B	10.71	11.40
Ha. C	0.52	0.50
Fleu. 2	3.32	3.29
Fleu. (dilué au 1/2)	1.77	1.70
Fleu. (dilué au 1/4)	0.87	0.87

Non seulement on n'a plus à préparer, avant chaque série de dosages, une solution alcoolique d'acétate, mais il devient possible d'envisager un nouveau perfectionnement de technique.

C. — *Elimination des substances éthéro-solubles et de l'acide oléique.* — Quoique les expériences décrites plus haut aient montré que, dans les conditions habituelles, la cholestérine, les graisses, les lécithines, ne troublent pas la réaction colorée, on peut concevoir des cas où ces substances atteindront un taux assez anormalement élevé par rapport à celui des sels biliaires pour qu'il soit nécessaire de les éliminer, au moins partiellement (1). On utilisera pour cela cette notion classique, que tous ces composés sont solubles dans l'éther, tandis que les sels biliaires sont pratiquement insolubles. Nous nous sommes assuré qu'il en est bien ainsi, même lorsque ces derniers ne se trouvent qu'en faible quantité, en dosant l'acide cholalique dans des solutions aqueuses alcalinisées de tau-

(1) Sur la teneur en graisses, lécithine, savons, acides gras, cholestérine des biles vésiculaires et des biles de fistule, voir les tableaux des pages 31 et suiv. On peut joindre à ces chiffres ceux de Grigaut [118], qui trouve de 0,20 à 6 gr. de cholestérine dans des biles vésiculaires et environ 0 gr. 40 dans la bile circulante. Selon Chabrol, Bénard et Gambillard [47], la moyenne normale dans le suc duodénal est de 0,60, la valeur maxima (2,50) ayant été observée par eux dans le diabète. Chiray et ses élèves [52, 53] admettent les taux moyens suivants : 0,20-0,70 dans la bile A, 1 à 1,50 dans la bile B, traces à 0,50 dans la bile C.

rocholate, avant et après avoir agité ces solutions avec de l'éther; ce traitement, qui constitue d'ailleurs la première manipulation du procédé de Coquelet, permettra de faire porter le dosage, à l'occasion, sur les biles débarrassées de la majeure partie de leurs constituants éthéro-solubles (1).

Ce n'est cependant pas leur intervention qui, en pareil cas, pourra se montrer gênante, mais plutôt celle des savons oléiques, auxquels nous avons déjà fait allusion; ces derniers n'étant pas solubles dans l'éther, le traitement par ce dissolvant les laissera dans la bile, avec les sels biliaires. Il suffirait évidemment de déplacer l'acide oléique par un acide minéral, pour que l'éther l'extrait en même temps que les substances précédentes. mais les *acides* biliaires, simultanément libérés, seront également entraînés. Ayant agité avec de l'éther des solutions aqueuses de sels biliaires additionnées d'acide chlorhydrique, nous n'avons en effet retrouvé dans les solutions qu'une quantité de sels biliaires inférieure à celle que nous avons mise en œuvre; une certaine proportion, faible mais non négligeable, des *acides* biliaires, est passée dans l'éther, et a pu y être dosée après évaporation de ce dissolvant. La même constatation, d'une solubilité appréciable de ces acides dans l'éther, avait déjà été faite au cours de ce travail.

Nous avons toutefois résolu cette difficulté en tirant parti de la propriété bien connue de l'oléate de plomb, d'être soluble dans l'éther, à l'inverse des oléates alcalins. Si l'on effectue la réaction d'Herzfeld sur une solution alcoolique d'oléate de soude à 2 grammes par litre (qui correspondrait au filtrat alcoolique d'une bile renfermant 10 grammes d'oléate par litre), on observe, comme nous l'avons signalé, une coloration bleu-grisâtre, et l'on peut calculer, après comparaison colorimétrique, qu'elle ferait commettre, en se superposant dans un dosage à celle que donneraient pour leur compte les sels biliaires, une erreur par excès inférieure à 0 gr. 30 d'acide cholalique par litre; quoique cette expérience fasse voir qu'une dose aussi considérable d'oléates ne provoque qu'une erreur presque négligeable, cette dernière est aisément évitée moyennant la formation d'oléate de plomb; si l'on ajoute en effet à une solution aqueuse d'oléate de soude à 10 grammes par litre, une quantité d'acétate de plomb suffisante pour que la double décomposition soit complète, il suffit d'agiter le mélange avec

(1) L'extraction par l'éther suffit pour éliminer la cholestérine, d'après Chiray, Milochevitch et Vasilescu [54].

de l'éther pour en éliminer très rapidement l'acide oléique, et la réaction colorée est alors parfaitement négative. Après avoir vérifié qu'au contraire les sels de plomb des acides biliaires ne sont pas solubles dans l'éther, nous avons ainsi traité des solutions renfermant, avec 10 grammes d'oléate par litre, des quantités connues de sel biliaire, soit 10 grammes, 4 grammes et 2 grammes (exprimées en acide cholalique); nous avons effectivement éliminé l'oléate et retrouvé 10 gr. 10, 4 gr. 10 et 1 gr. 90 d'acide cholalique.

Faute de données sur la teneur en savons du liquide duodénal, ce n'est que l'expérience qui peut montrer s'il est indispensable de recourir à ce traitement par l'éther en présence d'acétate de plomb. Nous avons donc fait subir à quelques biles les trois modes de défécation: 1° par l'alcool seul, qui n'élimine que les substances protéiques; 2° par l'alcool plombique, qui précipite aussi la majeure partie des pigments; 3° par l'alcool plombique après extraction étherée, afin d'enlever en outre les substances éthersolubles et l'acide oléique. Voici comment nous avons procédé dans ce dernier cas: à 2 cm³ de bile, mesurés dans un tube à essais jaugé à 10 cm³, nous avons ajouté 0 cm³ 5, d'une solution aqueuse d'acétate de plomb à 25 %, et agité énergiquement pour répartir dans le liquide l'abondant précipité formé; après addition de 10 cm³ d'éther, le tube bouché a été retourné doucement, à maintes reprises, pendant quelques minutes, puis placé verticalement jusqu'à ce que les liquides soient bien préparés; enfin, l'éther fut siphonné, sans entraînement du précipité qui occupe la surface de séparation, et le volume fut complété à 10 cm³ avec de l'alcool à 95°. Nous avons agité de nouveau et obtenu par filtration une dilution de bile au cinquième, comme dans les autres modes de défécation. Les dosages colorimétriques, effectués également sur 1 cm³ de filtrat, ont donné ces résultats:

	<i>Défécation par l'alcool</i>	<i>Défécation par l'alcool plombique</i>	<i>Défécation par extraction étherée</i>
Dez. A.	3.00	2.58	2.50
Dez. B.	20.00	17.24	17.24
Dez. C.	0.60	0.74	0.74
Mar. A.	5.25	4.95	4.95
Mar. B.	?	19.48	19.48
Mar. C.	2.08	1.83	1.85
Fleu. A.	2.27	2.17	2.19
Fleu. B.	12.82	11.92	11.36
Fleu. C.	2.03	1.95	2.06
Mart. A.	2.47	2.18	2.30
Mart. B.	4.00	3.93	3.87
Mart. C.	1.87	1.87	1.85

Ainsi que les essais comparatifs déjà exposés pour les deux premiers modes de défécation, et sans doute pour la même raison, l'introduction d'acétate de plomb conduit le plus souvent à des valeurs un peu inférieures à celles que l'on obtient après traitement par l'alcool seul. Par contre, les deux dernières séries de chiffres sont pour ainsi dire superposables, et le traitement par l'éther semble pouvoir être négligé; du moins n'avons-nous pas rencontré, pour notre part, de bile dont la richesse en substances parasites rende ce traitement obligatoire. Nous l'avons néanmoins décrit ici, pour le cas peu probable où de telles biles devraient être analysées (1).

En tenant compte de toutes ces observations, nous pouvons maintenant établir la technique suivante:

4° DOSAGE DES SELS BILIAIRES DANS LA BILE ET LE LIQUIDE DUODÉNAL

1) *Solutions et réactifs nécessaires*

a) Solution aqueuse d'acétate neutre de plomb à 25 % (2).

b) Alcool à 95°.

c) Acide acétique cristallisable.

d) Solution de furfural à 1 % dans l'alcool absolu.

e) Acide phosphorique concentré de $d = 1,71$ à $1,75$.

f) Solutions étalons d'acide cholalique (3) dans l'alcool à 80°.

Etalon I à 0 gr. 20 d'acide cholalique pour 100 cm³.

Etalon II à 0 gr. 10 d'acide cholalique pour 100 cm³.

Etalon III à 0 gr. 05 d'acide cholalique pour 100 cm³.

Etalon IV à 0,025 d'acide cholalique pour 100 cm³.

Etalon V à 0,0125 d'acide cholalique pour 100 cm³.

(1) Cette extraction éthérée devra être pratiquée, et vraisemblablement à plusieurs reprises, lorsque la contraction de la vésicule aura été provoquée par injection d'huile d'olive dans le duodénum; le liquide de tubage est alors mélangé d'huile. Par contre, l'emploi de sulfate de magnésie ne présente pas d'inconvénients; ce sel ne fait que consommer, pour sa précipitation, une certaine quantité de l'acétate de plomb. De même que pour tous les examens chimiques de liquide duodénal, il serait avantageux de ne pas introduire de substances étrangères dans le duodénum et de pouvoir toujours utiliser, par exemple, la méthode à l'hypophyse.

(2) Cette solution doit être filtrée et conservée à l'abri de l'air. La formation ultérieure d'un trouble ne présente pas d'inconvénients.

(3) Acide cholalique de Poulenc recristallisé dans l'alcool et séché de nouveau à l'étuve jusqu'à poids constant.

2° Matériel nécessaire

- a) Pipettes à deux traits de 0 cm³ 5, 1 cm³ et 2 cm³.
- b) Tubes à essais jaugés à 5 cm³ et à 10 cm³.
- c) Bain-marie formé d'un récipient métallique dans lequel peut être plongé un petit panier en fil de fer qui recevra les tubes.
- d) Colorimètre de Dubosq ou de Baudoin et Bénard (1).

3) Mode opératoire

Homogénéiser les liquides duodénaux par agitation et diluer de leur volume d'eau ceux qui sont fortement pigmentés (biles B).

Disposer dans un porte-tubes autant de tubes jaugés qu'il y a de biles à analyser. Numéroter ces tubes et placer en face de chacun d'eux un petit tube à essais bien sec surmonté d'un entonnoir garni lui-même d'un filtre plissé. Mesurer dans chaque tube jaugé 2 cm³ de bile, puis 0 cm³ 5 de solution d'acétate de plomb. Mélanger et ajouter, en agitant, de l'alcool à 95°, quantité suffisante pour 10 cm³. Filtrer en recueillant le filtrat dans le petit tube correspondant (2).

Disposer de nouveau le même nombre de tubes jaugés et numérotés et, de plus, cinq autres tubes semblables. Mesurer dans chaque tube 1 cm³ de filtrat et dans les cinq derniers 1 cm³ de solution étalon I, II, III, IV, V. Ajouter dans tous les tubes 0 cm³ 5 de solution de furfurol, et de l'acide phosphorique en quantité suffisante pour 5 cm³ (3). Mélanger très soigneusement en agitant les tubes à plusieurs reprises sans les retourner.

Placer les tubes dans le panier et les plonger ainsi tous en même temps dans l'eau bouillante pendant cinq minutes, puis dans un bain d'eau froide pendant cinq autres minutes.

Verser ensuite de l'acide acétique, quantité suffisante pour

(1) Contrairement à ce que l'on pourrait croire, les godets habituels de ces colorimètres ne sont pas mis hors d'usage par le contact du lut avec les liquides très acides dont on les garnit. Il serait toutefois avantageux de leur substituer des godets d'une seule pièce, à condition que le fond de ces derniers soit parfaitement plan.

Le colorimètre sera éclairé par la lumière naturelle, ou du moins par une lampe dite « lumière du jour ».

(2) Lorsque le dosage doit être pratiqué sans délai, il suffit de recueillir ainsi 2 ou 3 cm³ de filtrat; quand on le remet à plus tard, on remplit entièrement les tubes que l'on bouche soigneusement afin d'éviter toute volatilisation de l'alcool. Il se forme alors assez rapidement un faible précipité blanc que l'on remet en suspension dans le liquide au moment du dosage.

(3) Pour ajouter ainsi l'acide sans mouiller les parois, ce qui fausserait les mesures, on en garnira une ampoule à robinet d'où il s'écoulera en filet dans l'axe du tube.

10 cm³ (trait de jauge supérieur) et mélanger en retournant les tubes cinq ou six fois. Après quelques minutes, comparer au colorimètre la teinte donnée par chaque bile avec celle de l'étalon le plus voisin examiné lui-même sous l'épaisseur jugée convenable, et en veillant à ce qu'il n'adhère pas de bulles d'air à l'extrémité des plongeurs. Soit H cette épaisseur et H' celle sous laquelle la solution colorée doit être amenée pour que les teintes soient identiques. La teneur de la bile en sels biliaires, exprimée en acide cholalique et en grammes par litre, est donnée par les formules suivantes :

Avec l'étalon	I		$\frac{10 \times H}{H'}$	= S. B. par litre.
— —	II		$\frac{5 \times H}{H'}$	= S. B. —
— —	III		$\frac{2,50 \times H}{H'}$	= S. B. —
— —	IV		$\frac{1,25 \times H}{H'}$	= S. B. —
— —	V		$\frac{0,625 \times H}{H'}$	= S. B. —

Si la bile a été préalablement diluée au demi, on multipliera par 2 le résultat obtenu. Le calcul devra également être modifié lorsque la dilution de bile n'aura pas été faite comme d'habitude au 1/5. C'est ainsi que les biles animales vésiculaires seront simplement déféquées par un fort volume d'alcool, sans emploi de l'acétate de plomb; la bile se trouvera ainsi diluée au 1/100 par exemple ou même davantage, et l'on poursuivra le dosage sur 1 cm³ de cette dilution. Il suffira alors de se rappeler que les cinq tubes étalons renferment 2 mg., 1 mg., 0 mg. 50, 0 mg. 25 et 0 mg. 125 d'acide cholalique et d'effectuer les calculs en conséquence.

5° RÉSULTATS DONNÉS PAR CETTE MÉTHODE

1) Dosage des sels biliaires dans une même bile plus ou moins diluée

Bile Fleu, non diluée		3.32
— — diluée au 1/2		1.77
— — diluée au 1/4		0.87
Bile bœuf non diluée		40.50
— — diluée au 1/2		20.50
— — diluée au 1/4		10.75

2) *Analyse de biles avant et après addition
d'une quantité connue d'acide biliaire*

Bile bœuf	46.00	(en acide glycocholique)
Bile + 5 gr. p. 1000 d'ac. glycocholique .	51.50	— —
Bile + 15 gr. p. 1000 d'ac. glycocholique .	62.05	— —
Bile humaine (mélange)	8.60	(en acide cholalique).
Bile + 2 gr. p. 1000 d'acide cholalique	10.95	— —
Bile + 5 gr. p. 1000 d'acide cholalique .	13.04	— —

3) *Dosages comparatifs des sels biliaires
par la méthode gazométrique et par la méthode colorimétrique*

Ayant été faits à une époque où nos tubages se trouvaient interrompus, ces dosages comparatifs ont porté surtout sur des biles animales, ce qui ne les rend pas moins instructifs. C'est, d'autre part, à l'aide de coefficients calculés d'après le poids moléculaire, que les valeurs trouvées pour l'azote aminé (gazométrie) et pour l'acide cholalique (colorimétrie) ont été exprimées soit en « sels biliaires », soit en « acides biliaires », soit plus simplement en « acide cholalique »; le même mode d'expression a d'ailleurs été adopté pour les deux termes de chaque comparaison :

		<i>Gazométrie</i>	<i>Colorimétrie</i>
Bœuf	I (acides biliaires)	57.39	58.50
—	II (sels biliaires)	42.80	41.75
—	III (sels biliaires)	31.50	29.24
—	IV (acide cholalique)	47.10	49.40
Chien	I (sels biliaires)	75.00	60.00
—	II (sels biliaires)	37.60	36.60
—	III (acide cholalique)	58.70	57.30
Mouton	I (acide cholalique)	42.50	46.50
—	II — — — — —	48.78	49.50
—	III — — — — —	75.70	80.00
—	IV — — — — —	74.78	77.00
—	V — — — — —	47.38	49.50
—	VI — — — — —	67.72	72.00
—	VII — — — — —	71.10	68.20
Bœuf	V — — — — —	38.96	34.80
—	VI — — — — —	46.21	46.20
—	VII — — — — —	41.61	41.25
—	VIII — — — — —	50.85	53.00
Veau	I — — — — —	39.90	42.90
—	II — — — — —	35.98	40.40
—	III — — — — —	43.56	46.80
—	IV — — — — —	70.66	72.60
—	V — — — — —	55.94	57.50
—	VI — — — — —	74.16	77.60
—	VII — — — — —	50.99	50.00
Porc	I (sels biliaires)	37.67	3.10 (1)
—	II (acide cholalique)	38.46	5.88
—	III (acide cholalique)	44.87	6.24
—	IV (acide cholalique)	39.04	3.66

(1) Ces quatre résultats, obtenus avec des biles de porc, nous ont amené à étudier, comme on l'a vu, le comportement des divers acides biliaires (p. 124).

	Gazométrie	Colorimétrie
Tou B. (acides biliaires)	16.82	14.50
Tou C. (acides biliaires)	9.90	8.30
Malade X (acide cholalique)	3.82	4.42
Coq. C. (acide cholalique)	2.21	1.87
Coq. B. —	12.65	13.18
Val. A. —	2.62	2.66
Val. B. —	15.01	15.76
Val. C. —	1.31	1.87
Bail. A. —	3.63	4.00
Bail. B. —	10.47	9.76

Voici enfin quelques résultats donnés par des biles de chien, dont la teneur en acide taurocholique a été déterminée, en outre, par dosage du soufre alcool-soluble :

	Gazométrie	Colorimétrie	Soufre
Chien IV	102.6	109.5	103.5
— V	155.9	153.0	151.5
— VI	63.9	59.4	64.7
— VII	55.9	60.00	52.00

Il existe visiblement entre tous ces chiffres des écarts plus ou moins marqués. Cela tient évidemment à ce qu'aucune des méthodes n'est pas parfaitement rigoureuse, et à ce que les erreurs commises, peu importantes en elles-mêmes, tantôt se neutralisent en partie et tantôt au contraire s'ajoutent. D'autre part, ce n'est que grâce à des coefficients forcément conventionnels que l'on exprime ainsi en acides ou sels biliaires, les valeurs trouvées pour des éléments aussi différents que l'azote dégagé dans le dosage gazométrique, la coloration développée dans l'essai colorimétrique et, pour les biles de chien, les sulfates correspondant aux acides biliaires sulfurés. Et il en sera forcément ainsi tant que nous ne posséderons pas, sur les acides biliaires, des données plus exactes. Quoi qu'il en soit, il est remarquable que des procédés aussi dissemblables conduisent à des chiffres voisins, qui acquièrent de ce fait une réelle signification, tandis que les méthodes utilisées s'étaient pour ainsi dire réciproquement.

CONCLUSION

Sans avoir recours à une technique plus compliquée, ni plus longue que celles qui servent couramment à doser la cholestérine et les pigments, il est donc possible d'apprécier la teneur en sels biliaires de la bile et du liquide duodénal. Le groupe des sels biliaires étant encore imparfaitement connu, on n'obtient évidemment pas de valeurs absolues, que les meilleurs des procédés déjà décrits ne sauraient d'ailleurs donner, pour la même raison.

CHAPITRE VII

DOSAGE DES SELS BILIAIRES
SULFURÉS ⁽¹⁾

Etant donné que certains sels biliaires (p. 12) résultent de la copulation de la taurine et des acides cholalique, désoxycholique, etc., on devait chercher à ramener leur dosage à une évaluation du soufre présent dans la bile. C'est ce que font divers auteurs, soit qu'ils étudient la bile du chien, qui est censée ne contenir que des sels biliaires sulfurés, soit qu'ayant dosé les sels biliaires totaux, ils veuillent établir une distinction entre ceux qui dérivent de la taurine et ceux qui dérivent du glyocolle. Après avoir exposé brièvement ces techniques, nous rappellerons les objections qu'il a fallu envisager et décrirons nos propres essais.

I. MÉTHODES DE DOSAGE DES SELS BILIAIRES SULFURÉS

1° *Méthode de Spiro* [276]. — La bile (chien) est évaporée dans une capsule d'argent en présence de potasse et de nitrate de potassium. Le résidu est repris par l'eau chlorhydrique et les sulfates précipités à l'état de SO^4Ba , que l'on pèse après calcination.

2° *Méthode de v. Bergmann* [19]. — C'est surtout cet auteur qui, pour ses recherches sur la transformation, dans l'organisme, de la cystine en taurine, a utilisé ce mode de dosage. La bile du chien, recueillie par fistule, est additionnée de plusieurs volumes d'alcool, puis on lave le précipité à l'alcool et on amène le filtrat à un volume déterminé. En raison du faible espace

(1) Nous désignons ainsi, pour simplifier, les sels biliaires dont la molécule renferme du soufre. Ce dernier n'est toutefois pas assimilable au soufre d'une « sulfure », puisqu'il appartient, d'après les données classiques, à la taurine combinée à un acide biliaire proprement dit ; il est engagé, par conséquent, dans un groupement sulfonique. L'épithète « sulfuré » doit donc être prise ici dans le même sens que les termes « carboné », « oxygéné », que l'on applique couramment à de nombreuses substances, sans rien préjuger de la forme sous laquelle se trouvent le carbone, l'oxygène, etc...

occupé par le précipité de mucines, on peut éviter les lavages en notant simplement le volume du mélange avant la filtration et en effectuant le dosage sur une partie aliquote du filtrat. De toute manière, ce dernier est évaporé et le soufre dosé par pesée après destruction de la matière organique suivant Asboth (fusion alcaline). Le résultat est exprimé en taurine.

3° *Méthode de Schmidt et Dart* [269]. — De même que la suivante, cette méthode a été signalée page 56 à propos du dosage gazométrique. Alors que celle de von Bergmann n'est destinée qu'à l'analyse de la bile du chien, elle est applicable à l'examen des autres biles, dont Schmidt et Dart s'attachent à déterminer d'une part, la teneur en acide glycocholique, et d'autre part en acide taurocholique; il serait d'ailleurs plus exact de parler d'acides biliaires sulfurés et d'acides biliaires non sulfurés.

On évapore, dans une capsule de nickel, 60 cm³ de filtrat alcoolique au dixième, correspondant par conséquent à 0,6 cm³ de bile. Le résidu est chauffé avec un mélange de carbonate de soude et de bioxyde de sodium, dont les doses ne sont pas précisées, puis les sulfates sont précipités à l'état de SO³Ba. Connaissant ainsi la teneur de la bile en soufre, on en déduit le taux de l'acide taurocholique. Le calcul indique la dose d'azote aminé provenant de la taurine libérée par hydrolyse et, en déduisant ce chiffre de celui de l'azote aminé total des sels biliaires, on a l'azote du glyocolle, que l'on exprime en acide glycocholique.

3° *Méthode de Rosenthal et von Falkenhäusen* [245]. — Ces auteurs procèdent de la même manière que Schmidt et Dart, mais reproduisent dans leur mémoire une partie des calculs à effectuer. Ils opèrent sur le résidu d'évaporation d'un filtrat alcoolique correspondant à 5-10 cm³, au moins, de bile et emploient le mélange oxydant d'Asboth-Düring (CO³Na², CO³K², Na²O²). Après dosage du soufre sous forme de SO³Ba, on déduit, du chiffre trouvé, le taux de l'azote appartenant à la taurine. On a alors :

Az aminé des sels biliaires — Az taurine = Az glyocolle.

Az glyocolle × 33,12 = acide glycocholique.

Az taurine × 36,69 = acide taurocholique.

II. DISCUSSION DE CES MÉTHODES

Abstraction faite du procédé de Spiro, qui conduit à doser par surcroît le soufre protéinique, on doit considérer, avec les auteurs précédents, les objections suivantes :

1° *Le soufre dosé provient-il uniquement de la taurine?*

Les filtrats alcooliques de bile peuvent en effet contenir d'autres composés sulfurés : sulfates, sulfo-éthers, etc. En faisant état des constatations antérieures de Kunkel, qui avait montré que la bile de chien ne renferme que des traces négligeables de sulfates, von Bergmann a recherché également ces derniers et n'a obtenu que des résultats négatifs. Il ne décela pas davantage de sulfo-éthers. Hammarsten [129] a néanmoins trouvé des sulfates et des éthers sulfates dans la bile de quelques animaux et dans celle de l'homme (1); ces composés sont particulièrement abondants chez le requin. Par contre, Schmidt et Dart, Rosenthal et von Falkenhausen n'ont rencontré, dans les échantillons de bile qu'ils ont examinés (homme, bœuf, mouton, porc, chien) que des traces impondérables de sulfo-éthers ou de sulfates totaux. Schmidt et Dart considèrent comme possible l'existence de traces de cystine et de jécoringe, tandis que Rosenthal et von Falkenhausen ne jugent pas vraisemblable la présence de cystine, qui est d'ailleurs pratiquement insoluble dans l'alcool.

2° *La taurine dosée n'appartient-elle qu'aux sels biliaires sulfurés?*

Cette méthode indirecte de dosage exige évidemment que toute la taurine de la bile soit combinée aux acides biliaires pour donner l'acide taurocholique, etc., et qu'elle ne soit pas éliminée à l'état libre. D'après von Bergmann et Foster, Hooper et Whipple [98], la taurine ne saurait se trouver dans la bile sous cette dernière forme, car elle ne peut être excrétée par le foie qu'après sa conjugaison avec l'acide cholalique. Aussi l'absorption de cystine n'est-elle pas suivie d'une augmentation, dans la bile, du soufre de la taurine, tandis que cette augmentation se produit après ingestion de cholalate de soude. Il faut pour cela que l'animal en expérience (chien) possède une réserve suffisante de taurine, car, sous l'action d'une absorption répétée de cholalate, l'augmenta-

(1) Labbé et Vitry [164] ont dosé, dans des biles d'homme, de bœuf et de chien, une quantité notable d'éthers-sulfates.

tion du soufre biliaire devient de moins en moins marquée et finit par ne plus se manifester; elle reparaît lorsque la cystine est ajoutée au cholalate.

D'après ces résultats, la taurine ne peut exister dans la bile à l'état libre, puisque sa combinaison avec les acides biliaires est la condition nécessaire de son élimination par le foie.

Schmidt et Dart estiment cependant que la bile peut contenir de la taurine libre et, lorsque leur méthode d'analyse indique que les sels biliaires sulfurés prédominent, ils attribuent à la taurine la totalité de l'azote aminé dosable avant hydrolyse, et corrigent en conséquence le chiffre donné par le dosage du soufre. Comme on l'a vu, tous les auteurs qui ont institué des méthodes basées sur l'hydrolyse des sels biliaires admettent d'ailleurs que la bile renferme des acides aminés libres, à un taux en général peu élevé par comparaison avec celui des acides aminés combinés, et dosent cet azote aminé préexistant avant de décomposer les sels biliaires par la soude.

On ne saurait toutefois, semble-t-il, commettre une erreur notable en attribuant aux sels biliaires sulfurés tout le soufre alcool-soluble de la bile. Comme il pourrait être intéressant de savoir dans quel rapport se trouvent associés les sels biliaires dérivés du glyocolle et ceux qui dérivent de la taurine, nous avons institué une méthode analogue aux précédentes, mais mieux adaptée à des recherches en série.

III ETUDE D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DES SELS BILIAIRES SULFURÉS

Les méthodes antérieures comportent en effet deux opérations quelque peu délicates. On doit tout d'abord pratiquer une fusion alcaline avec toutes les précautions requises pour éviter les projections, et ensuite précipiter les sulfates par le chlorure de baryum. A moins qu'on ne mette en œuvre, en raison du faible pourcentage des sels biliaires en soufre, une dose importante de bile, le précipité de SO_4Ba est assez peu abondant pour que l'on soit toujours bien assuré d'échapper aux causes d'erreur que présente, tout classique qu'il soit, ce mode de dosage. Le temps qu'il exige mérite aussi d'être pris en considération.

Aussi semble-t-il judicieux, pour des recherches de physiologie, de recourir à un autre procédé de dosage des sulfates. Si on laisse de côté, comme apparemment discutables, les méthodes

« physiques » telles que celle de Hamburger [126] (mesure du volume du précipité) ou de Denis [80] (néphélométrie), on est amené à adopter la méthode à la benzidine de Raschig, vulgarisée par Gauvin et Skarzinski [109], et que Pohorecka-Lelecz [230], Lesure et Dunez [179-180] ont récemment utilisée pour le dosage des faibles quantités de soufre. Nous envisagerons successivement la destruction de la matière organique, le dosage du soufre dans les solutions de sulfates et dans la molécule de taurocholate, et l'emploi de cette méthode pour l'analyse de la bile (1).

1° *Destruction de la matière organique* (Minéralisation du soufre)

Cette opération peut être effectuée soit par voie « sèche », soit par voie « humide ». Pohorecka-Lelecz a utilisé comparativement divers modes d'oxydation : procédés de Benedict au nitrate de cuivre et au chlorate de potasse, de Wolf et Ostenberg, qui dérive du précédent, de Modrakowsky au bioxyde de sodium, et enfin une méthode à l'acide nitrique et au perhydrol employée par plusieurs auteurs. Ces différentes méthodes lui ayant fourni les mêmes résultats, Pohorecka-Lelecz recommanda particulièrement, pour les dosages en série, l'oxydation par l'acide nitrique et le perhydrol. Une autre raison de l'adopter, c'est que les réactifs introduits peuvent être éliminés par évaporation. Il convient, en effet, pour que le sulfate de benzidine précipite correctement, que le milieu soit aussi peu chargé que possible en sels minéraux; l'action empêchante des chlorures, que nous avons également observée, a été plusieurs fois signalée. Alors même que le produit étudié n'en apporte qu'une dose minime, ces chlorures résultent de la neutralisation par l'acide chlorhydrique du résidu alcalin fourni par la minéralisation; les nitrites subsistant après chauffage avec les poudres nitratées font subir en outre à la benzidine une altération profonde. Ayant cherché à doser le soufre de la taurine à l'aide d'une autre méthode d'oxydation par voie sèche, en employant, de même que P. Fleury [93], le nitrate de magnésie, nous avons pu, en précisant la dose minima de réactif, échapper à ces causes d'erreurs, mais la précipitation a semblé se faire d'une manière anormale, le précipité formé ayant tendance à colmater rapidement les filtres. Un autre inconvénient de l'oxydation par voie

(1) Sauf sur ces deux derniers points, nous nous abstenons de reproduire le détail de nos essais, sensiblement calqués sur ceux des auteurs cités.

sèche, c'est d'exposer à des erreurs par excès lorsque les creusets sont chauffés au gaz (1). Pohorecka-Lelec prescrivait d'utiliser le four électrique ou la lampe à souder. Nous nous sommes servi d'un bec Bunsen alimenté par les vapeurs d'alcool. Pour tous ces motifs, la minéralisation par l'acide nitrique et le perhydrol est préférable aux autres techniques. On doit y ajouter la méthode de Lematte, Boinot et Kahane [173], dans laquelle l'oxydation est obtenue à l'aide des acides nitrique et perchlorique, réactifs que l'on peut éliminer, de même que les précédents, par évaporation. Cette méthode nous a donné, ainsi qu'à Lesure et Dunez, de très bons résultats, mais nous l'utilisons plutôt pour les dosages pondéraux; l'oxydation des substances organiques est ici plus énergique et doit être faite, en surveillant le chauffage, dans un ballon d'assez grande capacité, ce qui conduit à évaporer finalement les liquides de lavage. En utilisant comparativement ces deux modes d'oxydation par voie humide, Lesure et Dunez ont obtenu, dans le cas des tissus, des valeurs plus fortes avec le réactif nitro-perchlorique qu'avec ceux de Pohorecka-Lelec; on devra donc s'assurer que ces derniers oxydent complètement le soufre des sels biliaires.

2° Dosage de petites quantités d'acide sulfurique par la méthode à la benzidine

Avant que n'ait été publié le travail de Pohorecka-Lelec, nous avons cherché à doser des quantités de soufre (sous forme d'acide sulfurique N/50) comprises entre 0 mg. 5 et 2 mg., en effectuant la précipitation avec le réactif de Gauvin et Skarzinski dont la formule figure dans tous les manuels d'urologie; ce réactif était préalablement dilué au cinquième. Les précipités étant lavés à l'eau, par centrifugation, les résultats furent, ainsi qu'il était à prévoir, inférieurs aux chiffres théoriques.

Nous avons ensuite suivi, sensiblement, les indications de Pohorecka-Lelec : « On ajoute à 5 cm³ de la solution de sulfate 2 gouttes de solution alcoolique de bleu de bromo-phénol à 0,04% et de l'acide chlorhydrique goutte à goutte pour amener une coloration jaune. On ajoute à cette liqueur 2 cm³ de solution de benzidine (2) et, deux minutes après, 4 cm³ d'acétone à 95%; puis on laisse la liqueur reposer pendant dix minutes. Pour filtrer

(1) Cette cause d'erreur a été également signalée par Bertrand et Silberstein [20].

(2) On suspend 4 gr. de benzidine dans 150 cm³ d'eau; on ajoute 50 cm³ d'acide chlorhydrique normal et on complète le volume à 250 cm³.

sous pression réduite le précipité de sulfate de benzidine, on emploie un tube à filtrer à plaque de verre poreux de Schott (12 G 2/5 7). On lave le précipité à l'acétone, ajoutée par trois portions de 1 cm³, et on introduit le tube filtrant dans un tube à essais en pyrex, avec de l'eau distillée à laquelle on ajoute 2 gouttes de solution aqueuse de rouge de phénol à 0,05 %. On chauffe à l'ébullition et on titre à chaud avec de la soude N/50. On chauffe de nouveau le tube, en agitant soigneusement le petit tube à filtrer noyé dans le liquide, pour détacher de la plaque de verre et dissoudre dans l'eau bouillante les dernières parcelles de sulfate de benzidine. Le liquide, d'abord rouge, se décolore. On y ajoute de la soude jusqu'à coloration rouge et on répète alternativement l'ébullition et la titration jusqu'à coloration rose stable à l'ébullition ». Dans nos essais, nous n'avons pas eu à acidifier tout d'abord par l'acide chlorhydrique, puisque nous opérons sur des solutions sulfuriques titrées; le précipité a été recueilli dans un creuset à plaque filtrante de Schott n° 63 a G3: la titration fut pratiquée dans un petit bécber en pyrex en présence de bleu de bromo-thymol (5 gouttes de la solution à 0,2 % de Mailard et Wundschendorff [188], la fin du titrage étant indiquée par la persistance, à l'ébullition, d'une coloration verte.

Nous avons noté ainsi ces résultats (en milligrammes) :

<i>Soufre introduit</i>	<i>Soufre trouvé</i>	<i>Erreur p. 100</i>
0,50	0,48	— 4,0
0,75	0,73	— 2,6
0,80	0,81	+ 1,2
1,60	1,64	+ 2,5
1,60	1,59	— 0,6
1,60	1,62	+ 1,2
1,60	1,58	— 1,2
2,40	2,44	+ 1,6
3,20	3,18	— 0,6

Lesure et Dunez [179] n'ont pu préparer le réactif suivant la formule indiquée par Pohorecka-Lelecz; la dissolution de la benzidine a été très imparfaite et la solution filtrée n'a pas précipité intégralement les sulfates. Ces auteurs délaient, au mortier, 40 gr. de benzidine avec 35 cm³ d'acide chlorhydrique ($d = 1,19$) et ajoutent de l'eau distillée q.s.p. 1000 cm³; après filtration, la solution est utilisable. Ils laissent la précipitation se poursuivre pendant au moins quinze minutes et recueillent le précipité sur un double filtre non coupé disposé dans un entonnoir de Buchner.

Après lavage, on titre, en présence de phénol-phtaléine, l'acidité développée à l'ébullition.

Nous n'avons pas rencontré cette difficulté, en raison sans doute de la valeur inégale, qu'indique d'ailleurs leur aspect variable, des échantillons de benzidine du commerce. Pour ne pas s'exposer à ces mécomptes, on doit toutefois retenir la proposition qu'ont faite Lesure et Dunez dans une seconde note [180], de remplacer la benzidine par son chlorhydrate « dont les caractères paraissent assez constants » (1). Dans ce même travail, ces auteurs ont attiré très judicieusement l'attention sur quelques causes d'erreurs, que nous avons observées pour notre part. Il est en effet indispensable de s'assurer de l'absence de soufre dans les réactifs utilisés (nous reviendrons plus loin sur ce point). On doit en outre employer, au lieu d'acétone pure, de l'acétone à 95 ou même 90 %; le chlorhydrate de benzidine est précipité par l'acétone pure et, si cette précipitation ne se produit pas au début du dosage parce que l'eau apportée par la solution étudiée s'y oppose, elle peut se faire lors des lavages. L'acétone présentant une réaction acide, il convient de terminer le lavage avec quelques gouttes d'eau distillée et de vérifier ensuite la neutralité de celle-ci. Nous préférons, pour ne pas risquer de dissoudre un peu du précipité, neutraliser tout d'abord l'acétone. L'eau distillée doit être rigoureusement neutre, ce qu'il est particulièrement aisé de vérifier à l'aide du bromo-thymol qui nous sert ensuite d'indicateur. Quant à l'acidité des papiers-filtres, nous n'avons pas à l'envisager, puisque nous recueillons le précipité sur un creuset de verre, abondamment lavé à l'eau.

En résumé, nous estimons que la méthode à la benzidine permet de doser commodément, au prix de quelques précautions facilement prises, de faibles quantités de sulfates. Comme le montrent les chiffres reproduits, la précision atteinte est très suffisante dans le cas présent.

3° Dosage du soufre des sels biliaires

Ces essais ont porté sur un taurocholate de soude du commerce, impur par conséquent, mais dont la teneur en soufre avait été déterminée au cours des analyses mentionnées page 36.

(1) « 4 grammes de chlorhydrate de benzidine sont introduits dans un matras avec environ 80 cm³ d'eau distillée; on fait dissoudre à une douce chaleur, on ajoute 4 gr. (ou 3 cm³. 5) d'HCl pur de d = 1,19 et l'on complète à 100 cm³ avec de l'eau distillée; la solution est ainsi prête pour l'usage et se conserve généralement très bien pendant plusieurs mois. »

Nous avons dû tout d'abord, suivant les prescriptions de Lesure et Dunez, rechercher le soufre dans les réactifs mis en œuvre. L'acétone dont nous disposions était exempte de soufre, ou du moins son résidu d'évaporation ne fournissait avec la benzidine qu'un louche extrêmement léger. Il n'en était pas de même des autres réactifs. Certains échantillons d'acide nitrique à 36 Bé et de perhydrol ne renfermaient sensiblement pas de soufre et ne donnaient, après évaporation, qu'un faible précipité dont il suffisait de tenir compte moyennant un dosage à blanc (consommant quelques dixièmes de cm^3 d'alcali N/50). Par contre, nous avons eu entre les mains un perhydrol contenant 0 gr. 27 de soufre par litre, c'est-à-dire que 5 cm^3 de ce réactif correspondaient à 4 cm^3 25 de soude N/50; un acide nitrique fumant renfermait une quantité de soufre voisine, de telle sorte qu'en utilisant pour l'oxydation 5 cm^3 de chacun de ces deux réactifs, on obtiendrait un précipité parasite de sulfate de benzidine dont la titration consommerait environ 8 cm^3 de solution titrée. On observe d'ailleurs, à ce point de vue, de très grands écarts entre les différents échantillons, fussent-ils de même origine, et ce n'est que par expérience que l'on peut faire un choix entre les réactifs que l'on possède.

Le taurocholate employé renfermait 2,80 % de soufre, dosé par pesée après fusion avec la poudre nitratée de Moreau. Nous avons dosé de nouveau le soufre, toujours par la méthode pondérale, en utilisant d'une part le réactif nitro-perchlorique de Lematte, Boinot et Kahane, et d'autre part l'acide nitrique et le perhydrol.

1° Dans un ballon à fond rond de 500 cm^3 , nous avons introduit 10 cm^3 de réactif nitro-perchlorique (1) et 0 mg. 50 de taurocholate. Le mélange fut chauffé avec précaution, à cause de la mousse abondamment formée, et le chauffage poursuivi pendant vingt minutes. L'excès de réactifs fut éliminé par addition d'acide chlorhydrique et évaporation, puis l'acide sulfurique précipité par le chlorure de baryum. Nous avons trouvé ainsi 14 mg. 5 de soufre, soit 2,90 %.

2° 0 mg. 50 de taurocholate furent traités à l'ébullition, dans un ballon, par 10 cm^3 d'acide nitrique à 36 Bé. Après quinze minutes, furent ajoutés goutte à goutte 10 cm^3 de perhydrol et

(1) Acide nitrique fumant ($d \approx 1,49$) 100 cm^3 ; acide perchlorique ($d = 1,615$) 50 cm^3 ; eau distillée, 100 cm^3 .

l'ébullition maintenue encore pendant dix minutes. L'excès de réactifs fut éliminé et le sulfate précipité comme précédemment. Nous avons trouvé 14 mg. 75 de soufre, soit 2,95 %.

Ces résultats précisent la teneur du produit en soufre et font voir que le traitement par l'acide nitrique et le perhydrol suffit pour oxyder rapidement ce dernier.

En vue du dosage par la méthode à la benzidine, une solution alcoolique de taurocholate fut préparée, dont 2 cm³ contenaient, d'après les analyses précédentes, 0 mg. 59 de soufre. Des volumes différents de cette solution furent évaporés dans des béchers en pyrex de 60 cm³ et le résidu additionné d'une perle de verre et de 10 cm³ d'acide nitrique. Après quinze minutes de faible ébullition, on fit arriver goutte à goutte 5 cm³ de perhydrol et on continua à chauffer pendant quinze minutes. Chaque solution fut évaporée à sec au bain-marie en ajoutant à la fin de l'évaporation 10 gouttes d'acide chlorhydrique, et le résidu fut dissous dans 10 cm³ d'eau distillée. Le soufre fut enfin dosé comme il est dit plus haut, le titrage étant effectué avec une solution de soude N/50 pour les doses de soufre inférieures à 1 mg., avec une solution N/20 pour les doses comprises entre 1 et 3 mg., et avec une solution N/10 pour les doses supérieures à ce dernier chiffre.

Les résultats sont exprimés en milligrammes.

<i>Soufre introduit</i>	<i>Soufre trouvé</i>	<i>Erreur p. 100</i>
0.295	0.291	— 1.3
0.590	0.596	+ 1
1.475	1.490	+ 1
1.475	1.474	0
2.95	2.87	— 2.7
4.425	4.470	+ 1
5.90	5.70	— 2
7.375	7.275	— 1.3

4° Dosage du soufre dans les biles animales

Nous n'avons examiné que des biles animales, car les liquides duodénaux dont nous disposions étaient chargés de sulfate de magnésie. Dans des filtrats alcooliques de biles de veau, de bœuf, de mouton et de porc, nous avons dosé le soufre : 1° par la méthode pondérale, en opérant sur des prises d'essais correspondant à 5 cm³ de bile, et en utilisant le réactif nitro-perchlorique; 2° par la méthode à la benzidine, sur 2 cm³ de bile, en oxydant le soufre par 5 cm³ d'acide nitrique et 5 cm³ de perhydrol. Ces deux

méthodes nous ont donné les chiffres suivants (en grammes par litre de bile) :

	<i>Méthode pondérale</i>	<i>Méthode volumétrique</i>
Veau I	5.65	5.42
Veau II	4.18	4.00
Bœuf I	4.86	4.66
Bœuf II	3.66	3.59
Mouton I	5.72	5.70
Mouton II	4.65	4.45
Porc I	2.29	2.10
Porc II	3.50	3.40

Quoiqu'ils soient un peu inférieurs à ceux que fournit la méthode pondérale, les résultats obtenus par volumétrie peuvent leur être substitués dans la pratique. Des expériences destinées à expliquer ces différences ont dû être interrompues et seront poursuivies ultérieurement.

En reprenant directement par l'eau le résidu d'évaporation de ces filtrats alcooliques de bile, et en ajoutant la solution de benzdine et l'acétone, nous n'avons pas obtenu de précipité perceptible (absence de sulfates). Il en fut de même après dissolution des résidus dans l'acide chlorhydrique normal et chauffage à l'ébullition pendant quinze minutes pour hydrolyser les éthers sulfuriques. Sans pouvoir conclure, de ces chiffres peu nombreux, que la bile de ces animaux est toujours exempte de sulfates et de sulfo-éthers, on est en droit, semble-t-il, de considérer comme peu probable une intervention marquée de ces composés, et de rapporter aux sels biliaires la totalité du soufre dosé.

Il convient toutefois, pour l'analyse de la bile de chien, de tenir compte, avec Schmidt et Dart, du soufre appartenant à la taurine non combinée. Dans quatre biles de chien, nous avons dosé, par gazométrie, l'azote aminé libre et l'azote aminé des sels biliaires, et le soufre total par la méthode à la benzidine. Si l'on exprime les résultats en acide taurocholique, on n'obtient des chiffres voisins avec les deux méthodes qu'à la condition de déduire du soufre total le soufre qui correspond à l'azote aminé libre, en considérant ce dernier comme apporté par la taurine non combinée. C'est ce qui résulte de ce tableau (en grammes par litre) :

	Az. aminé libre (Taurine)	S. de la taurine libre	Az. aminé des sels biliaires	Soufre total	S. des sels biliaires (corrigé)	Ac. tauro- cholique (gazom.)	Ac. tauro- cholique d'après S. total	Ac. tauro- cholique d'après S. corrigé
I	0.407	0.93	2.79	7.42	6.49	102.6	119.4	104.4
II	0.349	0.79	4.24	10.20	9.41	155.9	164.2	151.5
III	0.349	0.79	1.74	4.75	3.96	63.9	76.4	63.7
IV	0.652	1.49	1.52	4.75	3.26	55.9	76.4	52.4

IV. TECHNIQUE DU DOSAGE DES SELS BILIAIRES SULFURÉS DANS LES BILES ANIMALES

1° Réactifs nécessaires

- 1) Acide nitrique à 36° Bé ($d = 1,33$).
- 2) Perhydrol Merck, 100 vol.
- 3) Acide chlorhydrique concentré.
- 4) Solution de benzidine obtenue en dissolvant 4 grammes de produit dans 50 cm³ d'acide chlorhydrique normal et en complétant le volume à 250 cm³ avec de l'eau distillée; au bout d'une nuit, filtrer (1).
- 5) Acétone pure à 90 % neutralisée (2).
- 6) Acide chlorhydrique à 1/100 (en volumes).
- 7) Solution de soude environ N 50 dont le titre exact est déterminé à chaud en présence de bleu de thymol à l'aide d'une solution acide étalon.
- 8) Solution de bleu de bromo-thymol à 0,2 % de Maillard-Wundschendorff (3).

2° Essai des réactifs

Dans un bécher en pyrex de 60 cm³, mesurer 5 cm³ d'acide nitrique et 5 cm³ de perhydrol; évaporer à sec au bain-marie; ajouter 10 gouttes d'acide chlorhydrique et évaporer de nouveau; ajouter 10 cm³ d'eau, 4 cm³ de solution de benzidine et, après deux minutes, 10 cm³ d'acétone. S'il se forme un précipité, le recueillir, au bout de quinze à trente minutes, et l'évaluer comme dans un dosage proprement dit. Noter la valeur à déduire de tous les résultats obtenus avec ces réactifs.

(1) Si la benzidine se dissout mal, préparer le réactif suivant Lesure et Dunez ; voir p. 167, en note.

(2) A 10 cm³ d'acétone, ajouter 50 cm³ d'eau distillée neutre et 5 gouttes de solution de bleu de bromo-thymol. Noter la quantité de Na OH N/50 nécessaire pour donner au mélange une coloration verte. Calculer le volume de soude à employer pour neutraliser 90 cm³ d'acétone et compléter enfin à 100 cm³ avec de l'eau distillée.

(3) Peser 0 gr. 10 de colorant, mouiller avec 3 cm³ 5 de Na OH N 20, abandonner quelques minutes, ajouter 25 cm³ d'eau distillée, faire tiédir et agiter jusqu'à dissolution, compléter à 50 cm³.

3° Mode opératoire

On opère sur le filtrat alcoolique au cinquième servant au dosage des sels biliaires par gazométrie ou formol-titration.

Mesurer 5 cm³ de ce filtrat dans un bécher en pyrex de 60 cm³; évaporer à sec au bain-marie; ajouter une perle de verre et 5 cm³ d'acide nitrique; couvrir d'un verre de montre et chauffer pendant quinze minutes en maintenant une faible ébullition; éloigner la flamme et ajouter goutte à goutte 5 cm³ de perhydrol; couvrir le bécher et faire bouillir pendant quinze minutes; évaporer à sec au bain-marie; ajouter 10 gouttes d'acide chlorhydrique et évaporer de nouveau à sec jusqu'à disparition de l'acide.

Dissoudre le résidu dans 10 cm³ d'eau distillée; ajouter 4 cm³ de solution de benzidine et, après deux minutes, 10 cm³ d'acétone. Au bout de quinze à trente minutes, recueillir le précipité dans un creuset poreux de Schott 63 a G3, placé sur une fiole à essorer; ne réaliser au début qu'une aspiration modérée pour éviter le colmatage du filtre (1). Laver le bécher et le filtre avec 10 à 15 cm³ d'acétone, employés en trois fois, en vérifiant la neutralité des dernières gouttes de liquide.

Dans un bécher en pyrex de 100 cm³, introduire 30 cm³ d'eau distillée et 5 gouttes d'indicateur; porter l'eau à l'ébullition; si elle prend une coloration bleu-verdâtre (réaction alcaline), faire virer la teinte au jaune avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 1/100 et neutraliser avec la soude N 50 jusqu'à l'obtention d'une coloration verte. Laisser refroidir pendant quelques minutes et plonger dans l'eau le creuset contenant le sulfate de benzidine; agiter avec une fine baguette de verre pour détacher le précipité. Titrer à l'ébullition l'acidité développée, jusqu'à virage au vert franc, persistant malgré un nouveau chauffage. On est averti, avant la fin du titrage, par l'apparition d'une coloration vert-jaune, que l'addition de quelques gouttes d'alcool fait virer au vert franc. Il est aisé de reproduire cette même teinte verte à la fois lors du titrage de la soude, de l'essai des réactifs et du dosage proprement dit.

Sachant que 1 cm³ de soude N/50 correspond à 0 mg. 32 de soufre, calculer la teneur en soufre de la prise d'essai (1 cm de bile) et la rapporter au litre.

Si la bile (cas le plus fréquent) renferme des sels biliaires sul-

(1) Après un certain nombre de dosages, nettoyer le filtre à l'acide nitrique et le laver très soigneusement à l'eau.

furés et non sulfurés, dont l'azote aminé global a été dosé d'autre part, on effectue les calculs suivants :

Soufre $\times 0,437 =$ Az taurine.

Az aminé des sels biliaires — Az taurine = Az glycoColle.

Az glycoColle $\times 32,24 =$ sels biliaires non sulfurés (expr. en acide glycocholique).

Az taurine $\times 36,78 =$ sels biliaires sulfurés (expr. en acide taurocholique).

Si les sels biliaires sulfurés prédominent, on ajoute aux deux déterminations gazométriques de la méthode différentielle un dosage à blanc, avec les réactifs seuls, de façon à pouvoir évaluer l'azote aminé libre. On multiplie le chiffre trouvé par 2,285 pour avoir le soufre appartenant à la taurine libre (on admet en effet que l'azote aminé préexistant n'est apporté que par la taurine) et on déduit le résultat de celui qu'a donné le dosage du soufre. Le soufre « corrigé » est alors introduit dans le calcul précédent.

CHAPITRE VIII

MÉTHODES ACIDIMÉTRIQUE
ET POLARIMÉTRIQUE

Un double motif nous fait ranger ici les méthodes acidimétrique et polarimétrique qu'a proposées Jenke [155]. Ce mémoire était entièrement rédigé lorsque nous avons eu connaissance de son travail. En outre, la description des ces méthodes est accompagnée d'une critique de celles qui précèdent; de toute manière, l'exposé de ces objections devait donc suivre celui des techniques elles-mêmes.

Jenke estime que les méthodes pondérales, qui dosent du moins les acides biliaires « spécifiques » (1), ne permettent pas une séparation rigoureuse de ces acides et ne sont pas utilisables pour les recherches en série. Quant aux méthodes basées sur les réactions colorées (Pettenkofer et autres) elles comportent des causes d'erreur tenant au manque de spécificité de ces réactions. Les procédés qui reposent sur les variations de la tension superficielle ne donnent que des estimations sans aucun intérêt («völlig belanglos»).

La majeure partie du travail de Jenke est consacré aux méthodes indirectes, dans lesquelles on substitue, au dosage des acides biliaires spécifiques, celui des amino-acides qui leur sont combinés, soit que l'on évalue la taurine grâce au dosage du soufre, soit que l'on pratique la mesure gazométrique de l'azote aminé.

Dans le premier cas (Chapitre VII), on admet, avec von Bergmann, que la bile du chien ne contient que des sels biliaires sulfurés, et que tout le soufre présent appartient à ces derniers. Après avoir rappelé, ainsi que nous-même page 162, que Hammarsten a trouvé, dans la bile d'autres animaux, des sulfates et des éthers-sulfates, Jenke critique surtout la première des affirmations de von Bergmann. Il ne considère pas comme démontré que la bile du chien ne renferme que des sels biliaires dérivés de la taurine, car ce dernier auteur n'a étudié que l'élimination de cet amino-

(1) Il désigne ainsi les acides cholalique, désoxycholique, etc., pour les distinguer des acides « couplés » : acides glycocholique, taurocholique, etc...

acide, sans envisager le sort du cholalate absorbé. Il est vraisemblable que, lorsqu'une réserve suffisante de taurine fait défaut, l'acide cholalique se combine au glycocolle. L'augmentation du soufre biliaire n'est d'ailleurs pas proportionnelle à la dose de cholalate ingérée et Weiss a observé que, dans la bile du chien recevant de l'acide cholalique, on trouve plus d'acide cholalique que le dosage du soufre ne permet d'en attribuer à l'acide taurocholique. Stadelmann a décelé l'acide glycocholique dans la bile du chien, après absorption de glycocholate de soude.

Dans le second cas, les auteurs de méthodes basées sur l'hydrolyse alcaline des sels biliaires (Chapitres III, IV et V) tiennent pour établi que la bile ne contient que des acides biliaires « couplés » dont on apprécie le taux en dosant l'azote aminé. De même d'ailleurs que le procédé de von Bergmann, ces méthodes sont inexactes si les acides biliaires « spécifiques » existent dans la bile à l'état libre, et échappent par conséquent au dosage. Or, Wieland et Reverey [76] ont montré qu'il pouvait en être ainsi, sans que l'on soit en droit d'affirmer que les acides biliaires spécifiques se trouvent « naturellement » à l'état libre, car les bactéries décomposent très rapidement les acides couplés (1). Pour doser les acides biliaires dans la bile du chien, sans avoir à tenir compte de leur état libre ou combiné, Jenke a donc institué les deux méthodes suivantes :

1° Méthode acidimétrique

Après chauffage en milieu alcalin, les acides biliaires et les acides gras sont précipités par acidification; ces derniers sont éliminés sous forme de savons barytiques, et l'acide cholalique extrait par l'éther est dosé à l'aide d'une solution alcaline titrée.

Mode opératoire. — Recueillir la bile excrétée pendant vingt-quatre heures; ajouter un volume double d'alcool et abandonner le mélange pendant deux jours en l'agitant souvent; filtrer et laver le précipité avec de l'alcool; mesurer le volume du filtrat.

(1) Cette assertion ne concorde pas avec les observations de Licht [183] ; ayant fait agir, sur les acides biliaires couplés, diverses bactéries des voies biliaires et de l'intestin, cet auteur n'a observé aucune décomposition en acides aminés et acide biliaire spécifique. Eyner et Heyrowski ayant antérieurement noté que la réaction de Pettenkofer devenait négative, Licht a recherché si, quoique les acides biliaires restassent couplés, les bactéries ne provoquent pas quelque altération ; il a constaté que le noyau cholalique pouvait être si profondément modifié (surtout par les bactéries du groupe coli-typhique) qu'il échappe pour une grande part au dosage pondéral, alors même que la méthode gazométrique de Foster et Hooper ne décele pas de libération d'acides aminés.

Evaporer 100 cm³ de filtrat dans une fiole d'Erlenmeyer chauffée électriquement, jusqu'à ce que le volume soit d'environ 15 cm³. Ajouter 5 cm³ de NaOH à 30 % et chauffer à reflux, au bain-marie, pendant six à sept heures. Verser le mélange, en lavant la fiole, dans une fiole de 500 cm³. Acidifier, au rouge congo, avec de l'acide chlorhydrique concentré. Ajouter de l'alcool pour dissoudre le précipité d'acides, puis alcaliniser, en présence de phtaléine, avec de l'eau de baryte et faire bouillir. Après refroidissement, filtrer à la trompe en lavant à l'eau et concentrer le filtrat dans le vide jusqu'à obtention de quelques centimètres cubes. Filtrer de nouveau en lavant à l'eau le précipité. Verser le filtrat dans une ampoule à décantation, acidifier au rouge congo par l'acide chlorhydrique et agiter quatre ou cinq fois avec de l'éther. Evaporer à sec, dans le vide, les solutions éthérées et dissoudre le résidu dans un peu d'alcool aqueux. Titrer l'acide cholalique, en présence de phtaléine, avec une solution N/10 de soude, dont 1 cm³ correspond à 0 mg. 0408 d'acide. Rapporter le résultat au volume de bile recueilli pendant vingt-quatre heures.

Jenke a fait lui-même, à cette technique, quelques objections. Le désoxycholate de Ba, insoluble, devrait être précipité avec les acides gras, mais il est en partie maintenu en solution par le cholalate de Ba; aussi l'acide cholalique finalement extrait est-il accompagné d'une certaine quantité d'acide désoxycholique. En outre, l'oléate de baryum reste dissous et l'acide oléique s'ajoute aux acides précédents. D'autre part, les pigments donnent naissance à des composés encore indéterminés, à réaction acide, qui passent dans l'éther. Les résultats obtenus sont donc trop élevés et la méthode ne fournit que des valeurs comparatives sans fixer, d'une manière absolue, le taux de l'acide cholalique.

2° Méthode polarimétrique

Cette méthode dérive d'une technique abandonnée de Hoppe-Seyler [145] et consiste à éliminer, après hydrolyse alcaline, les substances optiquement actives autres que l'acide cholalique, de façon à ne doser pratiquement que ce dernier par polarisation. Jenke s'est attaché à doser, en outre, le cholestérol et les substances insaponifiables. Nous ne décrivons ici que les manipulations concernant les sels biliaires.

Mode opératoire. — Evaporer à sec 100 cm³ de filtrat alcoolique dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 cm³ chauffée d'abord

électriquement, puis au bain-marie. Dissoudre le résidu dans 25 cm³ de KOH à 15 % et faire bouillir à reflux pendant douze heures.

En lavant la fiole avec un peu d'eau, faire passer le liquide dans une ampoule de 250 cm³ et agiter trois fois énergiquement avec de l'éther. Laisser couler la portion aqueuse dans la fiole et verser les solutions éthérées dans une seconde ampoule de 500 cm³; les agiter (environ trois fois) avec un peu d'eau jusqu'à ce que l'eau ne présente plus de réaction alcaline. Les solutions aqueuses sont versées chaque fois dans la première ampoule, puis dans la fiole conique ayant servi au chauffage. (La solution éthérée est évaporée dans le vide et le résidu utilisé pour le dosage du cholestérol (à l'aide de la digitonine) et des insaponifiables (par pesée après élimination de l'excès de digitonine).

Neutraliser sensiblement le contenu de la fiole avec environ 7 cm³ d'HCl 7 N et l'agiter énergiquement, dans une ampoule, avec 100 cm³ d'un mélange d'éther de pétrole (1 vol.) et d'éther (5 vol.). Avant que les liquides se soient séparés, acidifier, au rouge congo, avec environ 1 cm³ d'HCl 7 N et agiter aussitôt énergiquement. En opérant rapidement, on évite l'agglomération des acides biliaires en grumeaux résineux d'extraction pénible. Laisser reposer et décanter la couche aqueuse dans la fiole conique, en versant la solution éthérée dans un ballon à vide. Dissoudre l'enduit coloré (pigments et acides biliaires) resté dans l'ampoule avec environ 1 cm³ de NaOH 7 N. Ajouter 100 cm³ du mélange éthéré et la solution aqueuse à épuiser de nouveau, acidifier avec environ 1 cm³ d'HCl 7 N et continuer comme précédemment. Ces extractions sont répétées 5 fois encore pour bien séparer les acides biliaires des pigments. Evaporer à sec, dans le vide, les solutions éthérées réunies et dissoudre le résidu dans l'alcool absolu.

Verser la solution dans une fiole jaugée de 100 cm³ et compléter au volume. Si la solution est trop colorée pour que l'examen polarimétrique soit possible, l'exposer pendant plusieurs jours à la lumière naturelle, qui détruit les pigments. Mesurer la déviation observée dans un tube de 4 décimètres. Le pouvoir rotatoire de l'acide cholalique en solution alcoolique étant de 34°,96, on a :

$$\text{Acide cholalique \%} = \frac{\text{déviation notée} \times 100}{34,6 \times 4}$$

La présence d'acide désoxycholique rend les résultats un peu trop élevés.

Jenke a observé par la suite qu'après exposition à la lumière des solutions alcooliques exemptes de cholestérol, les pigments devenaient insolubles dans l'éther, ce qui permet de supprimer l'extraction des acides biliaires par le mélange indiqué. Il a vérifié que l'activité optique des solutions d'acide cholalique n'était pas modifiée sous l'action de la lumière.

Nous croyons utile de reproduire les résultats obtenus par cet auteur, chez le chien, en utilisant comparativement plusieurs techniques; ces résultats sont exprimés en acide cholalique (en grammes) dans la bile recueillie pendant vingt-quatre heures.

		Volume de bile	Soufre	Acidimétrie	Polarimétrie	Gazométrie
		cm ³				
I.	1 ^{er} jour	155	1.553	1.834	—	—
	2 ^e —	140	1.609	1.822	—	—
	3 ^e —	150	2.091	3.084	—	—
	4 ^e —	110	1.012	1.652	—	—
Après absorption de 1 gr de cholalate de Na.						
II.	1 ^{er} jour	125	1.010	—	1.308	1.019
	2 ^e —	130	1.098	—	1.374	1.117
	3 ^e —	210	1.092	—	2.496	1.127
	4 ^e —	185	1.169	—	1.337	1.204
Après absorption de 1 gr ⁵ de cholalate.						

Les chiffres de l'expérience I montrent qu'après absorption du cholalate, le soufre biliaire s'est élevé, mais sans que cette augmentation soit proportionnelle à la dose de cholalate ingérée; il est retombé le lendemain à un faible niveau. A l'inverse du dosage du soufre, le dosage acidimétrique permet de retrouver dans la bile la quantité d'acide cholalique fournie au chien. Dans l'expérience II, la méthode polarimétrique révèle l'absorption du cholalate, alors que le dosage du soufre et celui de l'azote aminé ne le font pas.

L'auteur en conclut, d'une part que le chien est capable d'éliminer par la voie biliaire l'acide cholalique ingéré, sans que ce dernier doive nécessairement se transformer en acide couplé, et, d'autre part, que les méthodes indirectes ne fournissent pas, par conséquent, de données exactes sur le taux des sels biliaires. Il préconise surtout la méthode polarimétrique.

N'ayant pu encore mettre en œuvre les procédés de Jenke, nous ne pouvons en apprécier la valeur, du point de vue technique; les résultats obtenus semblent bien montrer que, si l'on fait absorber au chien du cholalate de soude, l'acide cholalique passe dans la bile à l'état libre. On ne saurait toutefois négliger les considérations suivantes :

1° Ces procédés ne permettent, pas plus que les autres, un dosage rigoureux de l'acide cholalique; ces dernier étant accompagné, en proportion inconnue, de composés acides ou optiquement actifs.

2° L'élimination par le foie d'acide cholalique non combiné, après ingestion de cholalate, ne constitue pas forcément un phénomène normal se produisant en dehors de semblables expériences de physiologie; auquel cas, il est surprenant que nous n'eussions pas observé de plus grands écarts en employant comparativement les méthodes par hydrolyse, qui ne dosent que les acides biliaires couplés, et la méthode colorimétrique, qui dose l'acide cholalique sous quelque forme qu'il se trouve.

3° Même en admettant l'existence simultanée, dans la bile, d'acides biliaires libres et d'acides biliaires couplés, il n'est pas inutile de pouvoir doser également ces derniers; leur formation n'est sans doute pas livrée au hasard et intéresse à la fois le métabolisme des acides biliaires et celui des acides aminés.

CONCLUSIONS

Le but de notre travail étant d'apprécier la valeur des diverses méthodes de dosage des sels biliaires dans la bile et le liquide duodénal, nous résumerons tout d'abord nos recherches sur ce point.

Après avoir envisagé, dans la première partie de ce mémoire, la chimie des acides biliaires, la composition générale de la bile et l'isolement des composés nécessaires à nos essais, nous avons exposé, d'un point de vue surtout documentaire, les méthodes pondérales et les techniques basées sur la mesure de la tension superficielle de la bile.

Nous avons effectué des expériences personnelles sur les autres procédés de dosage et étudié tout d'abord, en pratiquant l'hydrolyse alcaline des sels biliaires, l'application de la méthode gazométrique de van Slyke, suivant un nouveau mode opératoire particulièrement commode, au dosage de ces sels dans la bile. Ayant observé que l'hypobromite de soude restait sans action sur les amino-acides combinés aux acides biliaires proprement dits, nous avons pu apporter au dosage une utile simplification.

Nous avons vérifié en outre que le dosage portait bien sur l'azote aminé libéré par l'hydrolyse, en évaluant cet azote à l'aide de réactions très différentes de celles de van Slyke. Nous avons ainsi étudié, d'une part la réaction colorée donnée, avec la ninhydrine, par le glycocole et la taurine, et d'autre part la formol-titration de ces deux amino-acides. Nous avons été ainsi conduit à faire quelques commentaires sur le dosage de ces composés par la méthode au formol et à instituer un procédé volumétrique de dosage des sels biliaires. Ces essais nous ont également amené à considérer un nouveau mode d'élimination de l'ammoniaque à l'aide du réactif de Nessler et à tirer parti, comme pour la méthode gazométrique, de la décomposition par l'hypobromite des substances azotées gênantes.

Des raisons d'ordre pratique nous ont fait décrire ensuite une technique colorimétrique. Les réactions colorées des sels biliaires

ayant été passées en revue, et en particulier les nombreuses variantes de la réaction de Pettenkofer, nous avons étudié spécialement l'une d'elles pour établir une technique mieux adaptée que les précédentes aux recherches cliniques.

Pour permettre l'estimation des sels biliaires dérivés de la taurine, il convenait de mettre à profit, moyennant des essais préalables, certains procédés récemment décrits pour l'oxydation et le dosage du soufre. Nous avons ainsi appliqué à l'analyse de la bile la méthode volumétrique à la benzidine.

Quant aux méthodes acidimétrique et polarimétrique, les dernières en date, nous n'avons pu que joindre quelques remarques à leur description.

*
**

Nous tirerons de ce travail les conclusions suivantes :

La multiplicité même des techniques fait voir que le problème posé n'a pas encore reçu de solution parfaitement satisfaisante; il ne pourra sans doute en être autrement tant que nos connaissances sur les sels biliaires ne seront pas plus étendues. Il ne s'agit pas en effet seulement d'un ou de deux composés bien définis, comme pourrait le faire penser la dénomination courante de « glyco-taurocholates », mais d'un complexe dont tous les éléments, présents en proportion variable et mal précisée, ne se laissent pas également saisir. On ne peut donc guère pratiquer qu'une estimation globale de ces éléments, sans être bien assuré qu'elle soit toujours complète.

Il est néanmoins remarquable qu'en raison précisément de cette multiplicité de techniques, qui permet des recoupements, les résultats notés puissent être retenus et conduire, en physiologie et en clinique, à des déductions légitimes. Quoique les méthodes mises en œuvre soient très différentes, les chiffres trouvés sont en effet souvent de même ordre, ou même presque identiques. Sans perdre de vue les réserves que soulèvent encore, à certains égards, les notions obtenues et que comportent d'ailleurs, malgré les progrès réalisés dans ce domaine, la plupart des constatations de chimie biologique, bon nombre d'entre elles méritent crédit.

Nous estimons pouvoir classer ainsi les diverses méthodes de dosage :

Les méthodes pondérales ne paraissent pas aboutir à l'isolement quantitatif des sels biliaires; elles ont en outre été établies alors que certains de ces derniers n'étaient pas encore connus. Elles sont difficilement utilisables dans la pratique courante.

Le principe même des méthodes basées sur la mesure de la tension superficielle a été critiqué, de telle sorte que ces méthodes ne semblent permettre que des examens comparatifs.

Un intérêt particulier s'attache, à notre avis, aux techniques utilisant l'hydrolyse des sels biliaires. A moins que les objections élevées à leur sujet par Jenke ne soient corroborées par des déterminations très probantes, et à l'aide de méthodes elles-mêmes indiscutables, la réaction la plus simple et la plus générale des acides biliaires est certainement leur décomposition en acide « spécifique » et acide aminé. La possibilité de doser l'azote aminé, comme nous l'avons fait, au moyen de méthodes très dissemblables, rend praticable un précieux contrôle.

On ne saurait encore juger de l'opportunité du dosage des sels biliaires sulfurés, en dehors des analyses de bile de chien demandées par les recherches de physiologie; il ne semble pas en effet que les variations respectives, dans le liquide duodénal, des sels biliaires sulfurés et non sulfurés présente une signification quelconque. Nous n'avons toutefois pas cru superflu de prévoir un tel examen, pour lequel on pourra utiliser la méthode décrite, en provoquant l'excrétion de bile vésiculaire par un autre procédé que celui de Metzger-Lyon au sulfate de magnésie.

Le dosage colorimétrique fournit des résultats satisfaisants et susceptibles d'interprétation clinique, que M. Chiray et ses élèves s'attachent à préciser. Les causes d'erreur prévues, inhérentes à la nature de la réaction employée, semblent bien avoir été éliminées, et l'influence de celles qui peuvent subsister est inappréciable en raison de la teneur en sels biliaires du milieu analysé. Lorsque cette méthode fut décrite à la Société Médicale des Hôpitaux, MM. Chabrol, Bénard et Bariéty [48] ont fait remarquer que le dosage des sels biliaires dans le liquide duodénal, d'origine mal définie, n'exigeait pas l'emploi d'une méthode

chimique et qu'une estimation approchée, obtenue par stalagmométrie, était pratiquement suffisante. Il ne nous semble toutefois pas inutile de réduire le plus possible l'erreur commise, sans attribuer aux résultats une valeur absolue, qu'aucune méthode ne saurait encore leur conférer. Quant à l'interprétation de ces résultats, dans le cas du liquide duodénal, nous avons constamment souligné [55 à 59] l'intérêt de leur rapprochement avec ceux que donne le dosage des autres éléments biliaires.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,
L. GRIMBERT.

Vu :

Le Doyen de la Faculté,
RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
CHARLÉTY.

APPENDICES

APPENDICE I

TABLES POUR LE CALCUL DES RÉSULTATS DES DOSAGES GAZOMÉTRIQUES

Mode d'emploi, pages 74 et 85

Ces tables diffèrent légèrement de celles, plus restreintes, que nous avons données dans le *Bulletin de la Société Médicale des Hôpitaux*, [56], en ce qu'il a été tenu compte, pour l'établir, de la réduction à 0" de la hauteur observée au baromètre et de la tension de la vapeur d'eau. On n'y trouvera plus les coefficients fournissant le taux des « acides biliaires » par litre de bile. Si, au lieu d'exprimer les résultats en azote, on veut les traduire, conventionnellement, d'une autre manière, on utilisera les formules de la page 76.

PRESSION ATMOSPHERIQUE (en millimètres)

Température (en degrés)	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761
12	0.1150	0.1157	0.1159	0.1160	0.1162	0.1163	0.1165	0.1167	0.1168	0.1170	0.1171	0.1173	0.1174	0.1176	0.1178	0.1179	0.1181
13	0.1150	0.1151	0.1153	0.1155	0.1156	0.1157	0.1159	0.1161	0.1163	0.1164	0.1166	0.1167	0.1169	0.1170	0.1172	0.1173	0.1175
14	0.1144	0.1146	0.1147	0.1149	0.1150	0.1152	0.1154	0.1155	0.1157	0.1158	0.1160	0.1162	0.1163	0.1165	0.1166	0.1168	0.1169
15	0.1139	0.1140	0.1142	0.1143	0.1145	0.1147	0.1148	0.1149	0.1151	0.1153	0.1154	0.1156	0.1158	0.1159	0.1161	0.1162	0.1164
16	0.1133	0.1135	0.1136	0.1138	0.1139	0.1141	0.1143	0.1144	0.1146	0.1147	0.1149	0.1150	0.1152	0.1154	0.1155	0.1157	0.1158
17	0.1129	0.1131	0.1132	0.1134	0.1136	0.1137	0.1139	0.1140	0.1142	0.1143	0.1145	0.1146	0.1148	0.1150	0.1151	0.1153	0.1154
18	0.1124	0.1126	0.1127	0.1129	0.1130	0.1132	0.1133	0.1135	0.1136	0.1138	0.1139	0.1141	0.1143	0.1144	0.1146	0.1147	0.1149
19	0.1119	0.1120	0.1122	0.1123	0.1125	0.1126	0.1128	0.1129	0.1131	0.1132	0.1134	0.1136	0.1137	0.1139	0.1140	0.1142	0.1143
20	0.1111	0.1113	0.1115	0.1116	0.1118	0.1119	0.1121	0.1122	0.1124	0.1126	0.1127	0.1129	0.1130	0.1132	0.1133	0.1135	0.1136
21	0.1105	0.1106	0.1108	0.1109	0.1111	0.1114	0.1116	0.1117	0.1119	0.1120	0.1122	0.1123	0.1125	0.1126	0.1128	0.1129	0.1131
22	0.1099	0.1101	0.1103	0.1104	0.1106	0.1107	0.1109	0.1110	0.1112	0.1113	0.1115	0.1116	0.1118	0.1119	0.1121	0.1122	0.1124
23	0.1094	0.1096	0.1097	0.1099	0.1100	0.1102	0.1103	0.1105	0.1106	0.1108	0.1109	0.1111	0.1113	0.1114	0.1116	0.1117	0.1119
24	0.1088	0.1089	0.1091	0.1092	0.1094	0.1096	0.1098	0.1099	0.1101	0.1103	0.1104	0.1106	0.1107	0.1109	0.1110	0.1112	0.1113
25	0.1081	0.1082	0.1083	0.1085	0.1087	0.1092	0.1093	0.1095	0.1096	0.1098	0.1099	0.1100	0.1102	0.1104	0.1105	0.1107	0.1108

PRESSION ATMOSPHÉRIQUE (en millimètres)

Températ re (en degrés)	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778
12	0.1182	0.1184	0.1186	0.1187	0.1189	0.1190	0.1192	0.1193	0.1195	0.1197	0.1198	0.1199	0.1201	0.1203	0.1204	0.1206	0.1208
13	0.1177	0.1178	0.1180	0.1181	0.1183	0.1185	0.1186	0.1188	0.1189	0.1191	0.1192	0.1194	0.1195	0.1197	0.1199	0.1200	0.1202
14	0.1171	0.1173	0.1174	0.1176	0.1177	0.1180	0.1180	0.1182	0.1184	0.1185	0.1187	0.1188	0.1190	0.1191	0.1193	0.1194	0.1196
15	0.1165	0.1167	0.1168	0.1170	0.1172	0.1173	0.1175	0.1176	0.1178	0.1179	0.1181	0.1183	0.1184	0.1186	0.1187	0.1189	0.1190
16	0.1160	0.1161	0.1163	0.1164	0.1166	0.1167	0.1169	0.1170	0.1172	0.1174	0.1175	0.1177	0.1178	0.1180	0.1182	0.1183	0.1185
17	0.1156	0.1157	0.1159	0.1160	0.1162	0.1163	0.1165	0.1167	0.1168	0.1170	0.1171	0.1173	0.1174	0.1176	0.1177	0.1179	0.1181
18	0.1150	0.1152	0.1153	0.1155	0.1156	0.1158	0.1159	0.1161	0.1163	0.1164	0.1166	0.1167	0.1169	0.1170	0.1172	0.1173	0.1175
19	0.1145	0.1146	0.1148	0.1149	0.1151	0.1152	0.1154	0.1156	0.1157	0.1159	0.1160	0.1162	0.1163	0.1165	0.1166	0.1168	0.1169
20	0.1138	0.1139	0.1141	0.1142	0.1144	0.1145	0.1147	0.1148	0.1150	0.1152	0.1153	0.1155	0.1156	0.1158	0.1159	0.1161	0.1162
21	0.1132	0.1134	0.1135	0.1137	0.1138	0.1140	0.1142	0.1143	0.1145	0.1146	0.1148	0.1149	0.1151	0.1152	0.1154	0.1155	0.1157
22	0.1125	0.1127	0.1129	0.1130	0.1132	0.1133	0.1135	0.1136	0.1138	0.1139	0.1141	0.1142	0.1144	0.1145	0.1147	0.1148	0.1150
23	0.1120	0.1122	0.1123	0.1125	0.1126	0.1128	0.1129	0.1131	0.1132	0.1134	0.1135	0.1137	0.1138	0.1140	0.1141	0.1143	0.1144
24	0.1115	0.1116	0.1118	0.1119	0.1121	0.1122	0.1124	0.1125	0.1127	0.1128	0.1130	0.1132	0.1133	0.1135	0.1136	0.1138	0.1139
25	0.1110	0.1111	0.1113	0.1114	0.1116	0.1117	0.1119	0.1120	0.1122	0.1123	0.1125	0.1126	0.1128	0.1129	0.1130	0.1131	0.1134

APPENDICE II

SUR LA FORMOL-TITRATION DU GLYCOCOLLE
ET DE LA TAURINE

Cet appendice, mentionné page 96, se rattache au dosage volumétrique des sels biliaires par formol-titration de l'azote aminé.

1° *Emploi de la phénol-phtaléine et du bleu de bromo-thymol*

Les expériences ont porté sur des solutions décimales de glycolle et de taurine (1), dont nous utilisons 10 cm³. Il ne s'agissait donc pas encore d'évaluer de faibles quantités d'azote aminé. Nous avons associé ici, aux deux indicateurs étudiés, le thymolsulfone-phtaléine dont le virage au bleu foncé (pH=9,45) correspond sensiblement au virage de la phénol-phtaléine au rouge et qui a été employée par Sørensen et autres.

Sur chaque amino-acide nous avons fait, en double, 4 essais.

a) 10 cm³ de solution N/10 de produit, plus 10 cm³ d'eau bouillie, plus 10 gouttes de solution alcoolique de *phénol-phtaléine* à 1 % plus de la soude N/10 exempte de carbonate jusqu'à obtention d'une teinte rose pâle. La fiole témoin renfermait 20 cm³ d'eau bouillie, de la *phénol-phtaléine*, et une trace de soude pour l'obtention d'une même teinte rose pâle. 10 cm³ de formol non dilué et neutralisé furent ajoutés dans chaque fiole et l'acidité développée fut titrée avec la soude N/10 jusqu'à retour au rose pâle initial, indiqué par le témoin. C'était donc effectuer la formol-titration sans partir du point neutre et sans atteindre le rouge foncé.

b) Même technique, avec la *phénol-phtaléine*, mais en communiquant au liquide témoin une teinte rouge foncé et en poussant le titrage jusqu'à cette même teinte; le volume d'alcali (0 cm³ 3) ajouté au témoin était déduit du volume trouvé.

c) Même technique, avec deux gouttes de solution de *thymol-sulfone-phtaléine* à 0,4 %, le témoin étant amené au bleu foncé et le titrage arrêté à cette même teinte.

d) Même technique avec 10 gouttes de solution de *bleu de bromo-thymol* à 0,2 %, les solutions étant amenées au même vert très pâle, puis, après addition de formol, au bleu Fehling (témoin avec 0 cm³ 10 d'alcali N/10).

(1) Ces résultats ne sont évidemment valables que pour les deux amino-acides considérés. Les chiffres publiés par Mestrezat [199] montrent en effet des différences marquées dans le comportement des divers acides aminés que cet auteur a mis en œuvre.

Il va sans dire que, pour chaque essai, le formol était neutralisé en présence de l'indicateur choisi.

Ce tableau indique les volumes en cm^3 de solution alcaline N/10 utilisés (théorie 10 cm^3).

	<i>Glycocolle</i>		<i>Taurine</i>	
A	9.55	9.55	9.30	9.25
B	9.85	9.90	9.90	9.85
C	9.80	9.90	9.80	9.85
D	9.95	9.90	10.15	10.0

Les résultats de la série A montrent de nouveau que le titrage n'est pas terminé lorsqu'on obtient la teinte rose pâle; les chiffres trouvés sont alors beaucoup trop faibles; ceux des séries B, C et D sont plus homogènes, l'erreur maxima étant de 2 %. La thymol-sulphone-phthaléine (C) se comporte comme le phénol-phthaléine (B), mais ne semble pas offrir sur celle-ci un avantage marqué. Quant au bleu de bromo-thymol (D), il a fourni des résultats satisfaisants, quoique le pH finalement atteint ait été moins élevé qu'avec les deux autres indicateurs.

Nous avons ensuite cherché à doser des quantités plus faibles d'azote aminé, avec la phénol-phthaléine et le bleu de bromo-thymol employés concurremment, et en titrant l'acidité à l'aide d'une solution de baryte environ N/20. Lorsque les doses d'acide-amino introduites sont ainsi diminuées, on constate, plus nettement qu'en opérant sur des solutions N/10, que la « neutralisation » des solutions ne se fait pas pareillement en présence des deux indicateurs. Avec la phénol-phthaléine, le virage au rose pâle n'est atteint que progressivement, moyennant l'emploi d'un volume appréciable d'alcali, et il n'est pas toujours aisé de saisir la fin de cette neutralisation (1). Avec le bleu de bromo-thymol, la teinte vert très pâle, qui mérite bien mieux que la précédente l'appellation de teinte « neutre », est obtenue plus rapidement. Les essais suivants montrent nettement cette différence.

Nous ne décrivons que le premier de chaque série, les autres étant calqués sur le même schéma.

1 Dosage de glycocolle en présence de phénol-phthaléine

a) On opère sur 25 mg. 15 de glycocolle dissous dans 40 cm^3 d'eau bouillie neutre additionnée de 10 gouttes de solution de phénol-phthaléine. Une fiole témoin ne contient que l'eau et la

(1) Ce mot est pris ici dans le sens usuel de « neutralisation à la phthaléine ». Le pH réalisé n'est pas $\text{PH} = 7$.

phthaléine. Pour colorer le liquide témoin en rose, il suffit de 0 cm³ 04 de baryte N 20. Pour donner la même teinte rose à la solution de glycocolle, il faut 0 cm³ 45 de baryte, soit 0 cm³ 41 de plus.

β) Après addition dans les deux fioles de 5 cm³ de formol neutralisé, le liquide témoin ne change pas de teinte; pour ramener la solution d'amino-acide au même rose, il faut 6 cm³ 16 de baryte.

γ) A l'aide de 0 cm³ 41 d'alcali, on porte au rouge franc le témoin; pour donner cette même teinte rouge à la solution de glycocolle, il faut y ajouter encore 0 cm³ 49 de baryte.

δ) Donc, les deux solutions étant tout d'abord rose pâle, le volume d'alcali nécessaire pour titrer l'acidité produite, est de 6 cm³ 16 si l'on prend comme terme du dosage la régénération de la teinte rose pâle, et de $6,16 + 0,49 - 0,41 = 6$ cm³ 24 si l'on pousse le virage au rouge foncé; ces chiffres correspondent respectivement à 22 mg., 88 et 23 mg., 20 de glycocolle, soit à des rendements de 91 et 92,3 %. Si l'on tient compte maintenant du volume d'alcali qu'il a fallu introduire au début de l'expérience dans la solution analysée pour lui communiquer la teinte rose du témoin, le volume de liqueur N/10 utilisée pour atteindre le rouge foncé devient en réalité $6,24 + 0,41 = 6$ cm³ 65; ce volume correspond à 24 mg., 71 de glycocolle (rendement 98,3 %).

2° Dosage du glycocolle en présence du bleu de bromo-thymol

α) On opère également sur 25 mg. 14, en ajoutant 5 gouttes de solution d'indicateur à 0,2 %; il suffit ici de 0 cm³ 04 de baryte N/20 pour amener le liquide au vert pâle du témoin.

β) Après addition de formol, il faut 5 cm³ 42 d'alcali pour atteindre le même teinte témoin.

γ) Le mélange témoin étant coloré en bleu foncé avec 10 cm³ 10 de baryte, on doit ajouter 1 cm³ 55 de baryte dans la solution de glycocolle pour lui communiquer cette même teinte bleue.

δ) Donc, les deux solutions étant tout d'abord colorées en vert pâle, le volume d'alcali nécessaire pour titrer l'acidité produite est de 5 mg., 42 si l'on prend comme terme du dosage la régénération de la teinte verte, et de $5,42 + 1,55 - 0,10 = 6$ cm³ 86 si l'on pousse le virage jusqu'au bleu; ces chiffres correspondent respectivement à 20 mg. 14 et à 25 mg. 49 de glycocolle, soit à des rendements de 80 et de 101 %.

Nous avons fait 11 expériences de ce type, dont les résultats sont réunis dans ce tableau :

Phénol-phtaléine				Bleu de bromo-thymol			
Glycocolle				Glycocolle		Taurine	
Amino-acide (mg.)	25.14	25.14	62.85	65.35	26.15	65.35	26.15
Volume (cm ³) de la solution	40	10	20	20	20	20	15
Titre de la baryte	n/20	n/20	n/10	n/20	n/20	n/20	n/20
a) Volume consommé pour l'obtention de la première teinte (rose ou verte)	0.41	0.65	0.83	1.70	0.68	<0.04	<0.04
β) Volume consommé (corrigé) après for- mol pour retour à cette même teinte ..	6.16	6.04	7.45	8.30	3.22	5.80	3.92
Amino-acide correspondant	22.68	22.45	55.36	51.82	20.10	43.12	38.71
Rendement p. 100 de la théorie	91.1	89.3	88.1	79.3	76.8	68.6	93.6
γ) Volume consommé (corrigé) après for- mol pour l'obtention de la teinte rouge foncé ou bleue	6.24	6.04	7.45	8.30	3.22	8.25	4.20
Amino-acide correspondant	23.20	22.45	55.38	51.82	20.10	64.09	40.90
Rendement p. 100 de la théorie	92.3	89.3	88.1	79.3	76.8	97.5	100
δ) Volume γ + α (pour tenir compte de l'excès d'alcali introduit)	6.65	6.69	8.28	10.0	3.90	—	—
Amino-acide correspondant	24.71	24.86	61.54	62.44	24.35	—	—
Rendement p. 100 de la théorie	98.3	98.8	97.9	94.1	93.2	—	—

Ces chiffres font voir que, lorsqu'on prend comme indicateur la phénol-phtaléine, on n'obtient des valeurs utilisables qu'en évitant d'introduire dès le début du titrage un excès de liqueur alcaline; en cherchant à reproduire la teinte rose que donne à un témoin une seule goutte de solution N/20, on ne la communique à la solution d'acide aminé qu'en ajoutant un volume appréciable de liqueur alcaline, l'acide aminé se comportant vraisemblablement comme une substance tampon. Ce qui montre que, même pour atteindre ce rose, on a déjà mis en œuvre un excès d'alcali, c'est ce qui fait qu'après action du formol, on peut prendre comme terme de dosage cette teinte rose, sans pousser jusqu'au rouge franc; car si l'on verse dans le mélange témoin un volume connu d'alcali, ce qui le colore en rouge, il a suffi d'en verser le plus souvent un volume identique dans la solution analysée pour la colorer également en rouge, alors qu'il en faudrait évidemment davantage si le titrage de l'acide aminé n'était pas déjà achevé. Les résultats sont de toute façon trop faibles, à moins qu'on ne tienne compte de l'excès d'alcool introduit au début de l'opération.

Avec le bleu de bromo-thymol, une trace d'alcali donne à la solution d'acide aminé la teinte verte correspondant à pH 7 environ. En prenant cette teinte comme terme du titrage au formol, on n'obtient que des valeurs trop faibles; ces dernières deviennent satisfaisantes si l'on pousse jusqu'au bleu foncé.

On peut dire aussi, pour résumer ces constatations, qu'avec la phénol-phtaléine, le titrage étant effectué du rose au rouge foncé, on commet une erreur par défaut en faisant intervenir, dès le début, un certain volume d'alcali qui ne sera pas compté par la suite; et qu'avec le bleu de bromo-thymol, le titrage étant effectué du vert pâle au bleu foncé, c'est au contraire à la fin du dosage que l'erreur peut survenir, du fait que le pH du milieu est trop bas.

L'intérêt que présentent ces observations est d'ailleurs, dans le cas présent, plutôt théorique, car on ne saurait, semble-t-il, atteindre toujours une grande précision en dosant ainsi de faibles quantités d'acides aminés en solution relativement très diluée. De telle sorte que, dans la pratique, les deux indicateurs conviennent également et qu'il n'y a sans doute pas lieu de modifier sur ce point le mode opératoire classique.

2 Résultats de dosages portant sur des quantités variables d'acides aminés

Ces dosages ont été effectués en utilisant l'un ou l'autre des deux indicateurs, désignés ici par les lettres P (phénol-phtaléine)

et B (bleu de bromo-thymol), employés en même quantité que dans les expériences précédentes. La solution de baryte était N/10 ou N/20 et garnissait une burette graduée en 1/50 de cm³; un tube très fin permettait de n'en faire tomber que de très petites gouttes, afin que puisse être apprécié le 1/100 de cm³. La coloration des solutions était amenée à la première teinte rose perceptible ou au vert très pâle, puis l'acidité apparue après addition de 5 cm³ de formol était titrée jusqu'à ce que soit obtenue la teinte rouge ou bleu foncées d'un témoin approprié.

<i>Amino-acide introduit (mg)</i>	<i>Volume de la solution (cm³)</i>	<i>Indicateur</i>	<i>Amino-acide trouvé</i>	<i>Erreur p. 100</i>	
Glycocolle	2	10	B	2.04	+2
id.	5	10	B	4.88	—2.4
id.	5	20	B	4.91	—1.8
id.	5	10	B	5.01	+0.2
id.	10	20	B	9.48	—5.2
id.	10	20	B	9.68	—3.2
id.	10	20	B	10.03	+0.3
id.	10	20	P	10.40	+4
id.	15	10	B	14.44	—3.7
id.	25.12	40	P	24.53	—2.3
Taurine	10	20	B	9.70	—3
id.	20	20	P	19.52	—2.4
id.	40	20	B	40.14	+0.35
id.	40	20	P	39.70	—0.75

A la condition d'opérer avec soin et le plus rapidement possible pour éviter l'intervention du CO² atmosphérique, il est donc possible de doser ainsi de faibles quantités de glycocolle ou de taurine. Dans un travail que nous n'avons pu consulter, Clementi [62] aurait dosé des quantités moins élevées que celles-ci, à l'aide de solution N/50 ou N/100. Nous avons renoncé à employer de telles solutions pour ne pas trop diluer les mélanges lorsque l'azote aminé atteignait un certain taux. Il vaut mieux se servir de baryte N/20 ou même N/10, pourvu que l'on puisse en mesurer exactement le volume. Ces liqueurs titrées doivent évidemment être manipulées à l'abri de l'acide carbonique atmosphérique.

APPENDICE III

RÉCAPITULATION DES RÉSULTATS D'ANALYSES
DE BILES VÉSICULAIRES

Nous avons rassemblé les résultats en grammes par litre des analyses de biles animales pratiquées à l'occasion de ce travail, et dont certaines sont mentionnées dans les chapitres qui précèdent. Pour rendre ce tableau plus homogène, ils s'y trouvent parfois exprimés différemment; c'est ainsi par exemple que des résultats de dosages colorimétrique et gazométrique de la page 158, donnés alors en « sels » ou « acides biliaires » sont ici traduits, les uns et les autres, en « acide cholalique ». En outre, quelques différences, intéressant d'ordinaire les décimales, sont dues à ce que les résultats ont été calculés de nouveau en négligeant, dans le taux de l'azote, le troisième chiffre placé après la virgule. Etant donné le degré d'approximation du dosage d'azote, la seconde décimale, tout au plus, doit être retenue.

Dans la première colonne figurent les résultats des dosages de l'azote des sels biliaires, effectués à l'aide d'une des techniques basées sur l'hydrolyse alcaline.

La seconde colonne réunit les résultats exprimés, dans le cas des biles de bœuf, de veau et de porc, en « sels biliaires », en admettant, d'une façon tout à fait conventionnelle, qu'il s'agit d'une association, en proportion équimoléculaire, de glycocholate et de taurocholate de soude, et de ces sels seulement. Ceci dans le seul but de faciliter des rapprochements avec les résultats des autres auteurs (1^{re} partie, chapitre II). Le manque de précisions sur la formule des sels biliaires de porc ne permet pas d'utiliser un coefficient moins arbitraire. Les chiffres obtenus chez le mouton et le chien sont toutefois exprimés en acide taurocholique, car l'analyse de ces biles n'y décèle pas de sels biliaires non sulfurés.

Dans la troisième colonne, les résultats précédents sont donnés en « acide cholalique » et peuvent être aussi confrontés avec ceux des dosages colorimétriques, exprimés de la même manière dans la colonne suivante.

Le reste du tableau est consacré à l'évaluation des sels biliaires sulfurés et non sulfurés, exprimés respectivement en acide taurocholique et en acide glycocholique. Nous indiquons aussi les valeurs trouvées pour le soufre alcool-soluble, l'azote de la taurine, l'azote du glyocolle, et pour le rapport $\frac{\text{Azote glyocolle}}{\text{Azote taurine}}$

qui traduit les proportions respectives des deux groupes de sels biliaires, et qui présente de grandes variations. Les différences observées chez le mouton et le chien entre l'azote de la taurine et l'azote des sels biliaires sont trop faibles pour que l'on puisse les attribuer au glyocolle. Les sels biliaires dérivés de ce dernier amino-acide semblent bien faire défaut dans la bile de ces animaux, ou ne s'y trouver qu'en très faible quantité.

Bile	Azote des sels biliaires	Sels biliaires (Hydrolyse)	Acide cholalique (Hydrolyse)	Acide cholalique (Colorimétrique)	Soufre	Azote taurine	Acide taurocholique	Azote glycocholle	Acide glycocholique	Azote glycocholle Azote taurine
Bœuf I	2.50	91.50	72.85	—	3.01	1.31	43.13	1.19	30.51	0.01
—	2.51	91.00	73.14	—	—	—	—	—	—	—
—	2.61	95.52	76.65	—	—	—	—	—	—	—
Bœuf II	2.51	91.30	73.14	—	1.26	0.55	20.22	1.00	65.00	3.50
—	2.45	89.67	71.89	—	—	—	—	—	—	—
Bœuf III	2.73	99.91	79.55	—	—	—	—	—	—	—
— IV	1.49	54.53	43.14	—	2.33	1.10	40.45	1.63	54.13	1.43
—	1.47	53.80	42.83	—	0.95	0.41	15.07	1.63	35.80	2.63
Bœuf V	1.10	49.26	32.65	—	—	—	—	—	—	—
—	1.17	42.82	34.09	—	—	—	—	—	—	—
—	1.66	39.52	31.47	—	—	—	—	—	—	—
Bœuf VI	2.24	81.98	65.27	—	—	—	—	—	—	—
—	2.33	85.27	67.39	—	—	—	—	—	—	—
—	2.10	76.36	61.19	—	—	—	—	—	—	—
— VII	1.71	62.33	49.32	—	—	—	—	—	—	—
—	1.83	66.97	53.32	—	—	—	—	—	—	—
Bœuf VIII	3.50	128.10	101.99	—	—	—	—	—	—	—
—	3.65	133.50	106.36	—	—	—	—	—	—	—
Bœuf IX	1.63	59.65	47.49	48.84	—	—	—	—	—	—
— X	1.17	42.82	34.09	33.10	—	—	—	—	—	—
— XI	0.86	31.47	25.66	23.13	—	—	—	—	—	—

Bile	Azote des sels biliaires	Sels biliaires (Hydrolyse)	Acide cholalique (Hydrolyse)	Acide cholalique (Colorimétrie)	Soufre	Azote taurine	Acide taurocholique	Azote glycocholle	Acide glycocholique	Azote glycocholle Azote taurine
Bœuf XII .	1.62	59.29	47.20	49.40	—	—	—	—	—	—
— XIII .	1.34	49.04	39.04	34.80	2.17	0.94	34.57	1.49	46.49	1.41
— XIV .	1.58	57.82	46.04	46.20	3.35	1.42	52.22	0.16	5.31	0.11
— XV .	1.86	68.07	54.20	—	1.72	0.75	27.58	1.11	36.80	1.48
— XVI .	1.43	52.33	41.67	41.20	2.11	0.92	33.83	0.51	16.93	0.55
— XVII .	3.04	111.26	88.58	—	2.40	1.04	38.25	2.00	66.42	1.92
— XVIII .	1.17	42.82	34.09	—	0.50	0.21	7.72	0.99	31.83	4.56
— XIX .	1.74	63.88	50.70	53.00	2.56	1.11	40.32	0.63	20.92	0.56
— XX .	1.45	53.07	42.25	—	0.90	0.39	14.34	1.06	35.20	2.72
— XXI .	2.97	108.70	86.54	—	2.70	1.17	43.63	1.80	59.77	1.53
Veau I	1.81	66.24	52.74	—	—	—	—	—	—	—
—	1.86	68.07	54.20	—	—	—	—	—	—	—
Veau II	1.37	50.14	39.92	42.90	—	—	—	—	—	—
— III ...	1.23	45.01	35.84	40.40	1.84	0.80	29.42	0.43	14.28	0.53
— IV ...	1.49	54.53	43.41	46.30	1.63	0.73	26.84	0.76	25.23	1.04
— V ...	2.42	88.57	70.51	72.60	2.32	1.01	37.14	1.41	49.82	1.30
— VI ...	1.92	70.27	55.94	57.00	3.39	1.43	54.43	0.49	15.27	0.31
— VII ...	2.54	92.66	74.01	77.60	4.19	1.83	67.30	0.71	23.57	0.39
— VIII ...	1.26	46.11	36.71	—	1.06	0.49	16.91	0.30	20.56	1.73
— IX ..	2.73	99.91	79.55	—	2.56	1.11	40.82	1.62	53.80	1.45

Bile	Azote des sols biliaires	Sols biliaires (Hydrolysé)	Acide cholalique (Hydrolysé)	Acide cholalique (Colorimétrie)	Soufre	Azote taurine	Acide taurocholique	Azote glycocholle	Acide glycocholique	Azote glycocholle Azote taurine
Veau X	1.16	42.45	33.89	—	1.30	0.56	20.50	0.60	19.02	1.03
— XI ...	1.75	64.05	50.00	50.00	2.64	1.15	42.20	0.60	19.02	0.52
— XII ..	2.36	66.37	68.77	—	2.30	1.00	36.73	1.36	45.16	1.36
Porc I	1.05	71.37	56.82	—	—	—	—	—	—	—
—	2.00	73.20	53.23	—	—	—	—	—	—	—
Porc II	2.33	85.27	67.89	—	—	—	—	—	—	—
—	2.33	85.27	67.89	—	—	—	—	—	—	—
Porc III	2.64	96.92	76.92	—	—	—	—	—	—	—
— IV	1.03	37.66	30.01	3.10	—	—	—	—	—	—
— V	1.32	43.31	33.46	5.88	—	—	—	—	—	—
— VI ...	1.54	56.36	44.37	6.24	—	—	—	—	—	—
— VII ...	1.34	49.04	39.04	3.66	—	—	—	—	—	—
—	2.05	75.63	59.73	—	1.00	—	17.23	1.53	52.47	3.36
Mouton I ...	0.90	33.10	26.22	—	—	—	—	—	—	—
—	0.88	32.36	25.64	—	—	—	—	—	—	—
Mouton II ..	2.24	81.43	65.27	—	—	—	—	—	—	—
—	2.34	85.64	63.13	—	—	—	—	—	—	—
—	2.30	84.13	67.02	—	—	—	—	—	—	—
Mouton III ...	1.49	54.89	43.41	—	—	—	—	—	—	—

Bile	Azote des sels biliaires	Sels biliaires (Hydrolyse)	Acide cholalique (Hydrolyse)	Acide cholalique (colorimétrique)	Soufre	Azote taurine	Acide taurocholique	Azote glycerolique	Acide glycerolique	Azote glycerolique Azote taurine
Mouton III ..	1.52	55.90	44.29	—	—	—	—	—	—	—
—	1.60	59.84	46.62	—	—	—	—	—	—	—
Mouton IV ..	1.44	52.96	41.96	—	—	—	—	—	—	—
—	1.41	51.85	41.03	—	—	—	—	—	—	—
Mouton V ..	1.46	53.69	42.54	46.50	—	—	—	—	—	—
— VI ..	1.67	61.42	48.66	49.50	3.70	1.61	59.21	—	—	—
— VII ..	2.59	95.26	75.47	80.00	6.00	2.62	96.36	—	—	—
— VIII ..	2.55	93.78	74.30	77.00	5.84	2.55	93.78	—	—	—
— IX ..	1.62	59.88	47.20	49.50	3.87	1.69	62.15	—	—	—
— X ..	2.32	85.52	67.60	72.00	5.00	2.18	80.18	—	—	—
— XI ..	2.44	89.74	71.10	68.20	5.30	2.31	84.96	—	—	—
— XII ..	1.96	71.72	56.82	—	4.40	1.92	70.61	—	—	—
Chien I	1.38	50.75	40.21	—	—	—	—	—	—	—
—	1.40	51.49	40.79	—	—	—	—	—	—	—
Chien II ..	2.05	75.03	59.73	54.71	—	—	—	—	—	—
— III ...	1.03	37.69	30.01	29.02	—	—	—	—	—	—
— IV ..	2.01	73.56	58.57	57.30	—	—	—	—	—	—
— V ...	2.79	102.61	81.30	86.72	6.49	2.83	104.43	—	—	—
— VI ...	4.24	155.94	123.55	121.17	9.41	4.11	151.16	—	—	—
— VII ..	1.74	63.99	50.70	47.04	3.96	1.73	63.62	—	—	—
— VIII ..	1.52	55.90	44.29	47.52	3.26	1.42	52.22	—	—	—

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ABDERHALDEN (E.). — *Neuere Ergebnisse der Eiweisschemie*. (Fischer), Léna, 1909, p. 24.
- 2 ABDERHALDEN (E.). — *Biochemisches Handlexikon*, 1911, 3, 310 et Sup., p. 494.
- 3 ABDERHALDEN (E.) et LAMPE (A. E.). — Weiterer Beitrage zur Kenntniss des Schicksals von in dem Magendarmkanal eingefuhrten einzelnen Aminosäuren, Aminosäuregemischen, Peptonen und Proteinen. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1912, 81, 473.
- 4 ABDERHALDEN (E.) et SCHMIDT (H.). — Einige Beobachtungen und Versuche mit Triketohydrinddehydhydrat (Ruhemann). *Ztschr. physiol. Chem.*, 1913, 85, 143.
- 5 ABDERHALDEN (E.). — *Die Abderhaldensche Reaktion*, 5^e éd., Berlin (Springer), 1922.
- 6 ADLER (A.). — Ueber Verhalten und Wirkung von Gallensäuren im Organismus. *Ztschr. f. ges. exp. Med.*, 1925, 46, 371.
- 7 ALDRICH (M.) et BLEDSOE (M. S.). — A quantitative Pettenkofer test applicable to the determination of bile acids in blood. *Journ. biolog. Chem.*, 1928, 77, 519.
- 8 AMBARD (L.) et HALLION (L.). — Sur une modification d'uréomètre pour le dosage de l'urée du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 9 novembre 1912.
- 9 ARBRE (DE L') (W. F.). — Verbindungen der Alkaloïde mit Gallensäuren. *N. Jahrb. Pharm.*, 37, 99 (d'après *Chem. Centralbl.*, 1872, 231).
- 10 ARTHUS (M.). — *Précis de chimie physiologique*, 8^e éd., 1918, p. 268 (Masson).
- 11 AUGUSTE (C.). — Le taux des chlorures et des substances azotées dans le liquide duodénal des urémiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, 10, 386.
- 12 BAGINSKY et SOMMERFELD. — *Verhandl. d. physiol. Ges. zu Berlin*, 1894-95 (cité par Rosenbloom [244]).
- 13 BANG (I.). — Ueber die Darstellung der Taurocholsäure. *Hofmeister Beitr. f. chem. Physio. u. Pathol.*, 1906, 7, 148.
- 14 BANG (I.). — Cité par Hammarsten [133].
- 15 BARDACHZI (F.). — Studie über die Tryptophan zugeschriebenen Eiweissreaktionen. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1906, 48, 158.
- 16 BARIÉTY (M.). — *Des sels biliaires ; méthodes de caractérisation ; étude physioclinique. Thèse Médecine*, Paris. 1927.
- 17 BARRAL (E.). — *Précis d'analyse chimique biologique*, 1908, p. 193 (Bailliére).
- 18 BECKER (F.). — Eine Modification der Pettenkoferschen Reaktion. *Chem. Ztg.*, 1882, 6, 812.
- 19 BERGMANN (Von). — Die Überfuehrung von Cystin in Taurin in tierischen Organism. *Hofm. Beitr. f. chem. Physio. u. Pathol.*, 1904, 4, 192.

- 20 BERTRAND (G.) et SILBERSTEIN (L.). — Sur la teneur en soufre total de la terre arable. *C. R. Acad. Sc.*, 1927, 184, 1388.
- 21 BETH (H.). — Pathologie der Gallensekretion. I) Eine neue Methode zur quantitativen Schätzung der Gallensäuren im Duodenalsaft. *Wiener Arch. f. inner. Med.*, 1921, 2, 563.
- 22 BIAL (M.). — Über den Befund von gepaarter Glykuronsäuren in der Galle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1905, 45, 258.
- 23 BIERRY (H.), FEUILLÉ (E.), HAZARD (R.) et RANC (A.). — Dosage des acides aminés. *C. R. Soc. Biol.*, 25 juillet 1913.
- 24 BLANKENHORN (M. A.). — The distribution of bile in certain types of jaundice. *Arch. int. Med.*, 1918, 21, 282.
- 25 BŒDECKER (Fr.). — Zur Kenntnis ungesättigter Gallensäuren. *Ber. Chem. Ges.*, 1920, 53, 1852.
- 26 BŒDECKER (Fr.) et VOLK (H.). — II Abhandlung. Über eine Isomere der Apocholsäure. *Ber. Chem. Ges.*, 1921, 54, 2489.
— III. Abh. Über die Beziehungen der Apocholsäure. Dioxycholsäure (Schm. 260°) und Cholsäure zur Desoxycholsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1922, 55, 2302.
- 27 BOGOMOLOFF. — *Centralbl. f. med. Wissench.*, 1869, 532 (cité par Neubauer-Huppert. *Analyse des Harns*, 1913).
- 28 BOIVIN (A.). — Nouvelle méthode microanalytique de dosage de l'urée en biologie. *Thèse Médecine*, Montpellier, 1926.
- 29 BONDI (S.) et MULLER (E.). — Synthese der Glykocholsäure und Taurocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1906, 47, 499.
- 30 BONNANI (A.). — Beitrag zur Kenntnis der menschlichen Galle. *Maly's Jahrb. f. tier. Chem.*, 1902, 32, 508.
- 31 BORSCHÉ (W.) et ROSENKRANZ (E.). — Untersuchungen über die Konstitution der Gallensäuren. I. Mitteilung. Über Cholsäure, Isocholsäure und Pseudocholsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1919, 52, 342.
- 32 BORSCHÉ (W.). — II Mitt. Über Dehydrocholsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1919, 52, 1353.
- 33 BORSCHÉ (W.). — Methoden der Abbau und Aufbaustudien auf dem Gebiete der Gallensäuren. *Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, 1922, Abt I, T 6, H I, 249-284 et 795-812.
- 34 BORSCHÉ (W.) et HALLWASS (F.). — IV Mitt. Über Reduktodehydrocholsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1922, 4, 3318.
- 35 BORSCHÉ (W.) et FRANK (R.). — VI Mitt. Über die Kondensation einiger Ketonsäuren der Cholsäuren-gruppe mit aromatischen Aldehyden und mit Isatin. *Ber. chem. Ges.*, 1924, 57, 1373.
- 36 BORSCHÉ (W.). — VII Mitt. Über ein Keton $C^{22}H^{32}O$ aus Desoxybilansäure. *Ber. chem. Ges.*, 1924, 57, 1435.
- 37 BORSCHÉ (W.) et FRANK (R.). — IX Mitt. Über die katalytische Reduktion einiger Ketonsäuren der Gallensäure-Gruppe. *Ber. chem. Ges.*, 1926, 59, 1748.
- 38 BORSCHÉ (W.) et FRANK (R.). — X Mitt. Über die Konstitution der Ciliansäure und einiger anderer Polycarbonsäuren der Cholsäure-gruppe. *Ber. chem. Ges.*, 1927, 60, 723.
- 39 BORSCHÉ (W.) et FRANK (R.). — Über Ciloxansäure. *Ber. chem. Ges.*, 1927, 60, 1216.

- 40 BORSCHÉ (W.) et FESKE (E.). — XIII Mitt. Über die katalytische Reduktion einiger Ketonsäuren der Gallensäure-Gruppe. *Ztschr. phys. Chem.*, 1928, 176, 109.
- 41 BORSCHÉ (W.) et FESKE (E.). — XIV Mitt. Über die Kondensation der Dehydrocholsäure mit sich selbst und mit aromatischen Aldehyden. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1928, 178, 148.
- 42 BOURNIGAUULT et BITH. — Méthode de dosage des acides aminés dans l'urine et de sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1914, 76, 114.
- 43 BRAND (J.). — Beiträge zur Kenntnis der menschlichen Galle. *Arch. f. d. ges. Physiol.*, 1902, 90, 496.
- 44 BUGLIA (G.). — Hängt die Resorption von der Oberflächenspannung der resorbierten Flüssigkeiten ab? *Biochem. Ztschr.*, 1909, 22, 1.
- 45 BUISSON (A.). — Contribution à l'unification des méthodes analytiques pour le dosage de l'ammoniaque dans les eaux. *Thèse Doctorat Pharm.*, Paris, 1907.
- 46 CHABROL (E.) et BÉNARD (H.). — Cholémie saline et cholestérinémie. *Gazette des Hôpitaux*, 9 avril 1921.
- 47 CHABROL (E.), BÉNARD (H.) et GAMBILLARD (M.). — Le tubage duodénal en pathologie hépatique et biliaire. *Journ. méd. français*, 1924, 13, 481.
- 48 CHABROL (E.), BÉNARD (H.) et BARIÉTY (M.). — Le dosage des sels biliaires dans le liquide duodénal. *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 8 fév. 1929.
- 49 CHAUFFARD et GOURAUD. — Valeur clinique de la réaction de Haycraft pour la recherche des principes biliaires dans les urines. *Journ. Phys. et Pathol. gén.*, 1901, 461.
- 50 CHIRAY (M.) et LEBON (J.). — Le tubage duodénal (Masson), 1924.
- 51 CHIRAY (M.), MILOCHEVITCH (M.) et PETROVITCH (L.). — Dosage et variations de la bilirubine dans le suc duodénal prélevé par tubage. *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 4 juillet 1924.
- 52 CHIRAY (M.) et LECLERC (R.). — Etudes sur les variations de la cholestérine dans le suc duodénal prélevé par tubage (la cholestérine de la bile vésiculaire et de la bile hépatique). *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 8 février 1924.
- 53 CHIRAY (M.), LECLERC (R.), BENDA (R.) et MILOCHEVITCH (M.). — La cholestérinocholie dans la lithias biliaire. *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 31 juillet 1925.
- 54 CHIRAY (M.), MILOCHEVITCH (M.) et VASILESCU (M.). — Dosage de la cholestérine dans le suc duodénal prélevé par tubage. *Arch. malad. app. digestif et de la nutrition*, 1925, 15, 768.
- 55 CHIRAY (M.) et CUNY (L.). — Dosage des acides biliaires dans le liquide duodénal. *Journ. Pharm. Chim.*, 1927 (8), 5, 474.
- 56 CHIRAY (M.) et CUNY (L.). — Dosage des acides biliaires dans le suc duodénal prélevé par tubage. *Soc. méd. Hôp. Paris*, 25 février 1927.
- 57 CHIRAY (M.) et CUNY (L.). — Dosage colorimétrique des sels biliaires dans le liquide duodénal. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1928 (8), 7, 97.
- 58 CHIRAY (M.) et CUNY (L.). — Sur le dosage colorimétrique des sels biliaires dans la bile et le liquide duodénal. Modifications de technique. *Journ. Pharm. Chim.*, 1929 (8), 9, 202 et 250.
- 59 CHIRAY (M.), CUNY (L.) et MARCOTTE (A.). — Dosage colorimétrique des sels biliaires dans la bile et le liquide de tubage duodénal. *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 25 janvier 1929.

- 60 CHIRAY (M.) et PAVEL (I.). — Physiologie de la vésicule biliaire (in *Traité de Physiologie normale et pathologique de Roger*), 1928, t. 3, p. 297 (Masson).
- 61 CHIRAY (M.) et MARCOTTE (A.). — Les sels biliaires de la bile au cours des cholécystites. *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1930.
- 62 CLEMENTI (A.). — *Atti R. Acad. d. Lincei*, Roma, 1915 (5), 24, II, 51 et 102; 1916, 26, I, 261 (d'après *Chem. Zentralbl.*, 1916, I, 1267; 1917, II, 322).
- 63 CLEMMENSEN (E.). — Reduktion von Ketonen und Aldehyden zu den entsprechenden Kohlenwasserstoffen unter Anwendung von amalgamierten Zink und Salzsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1913, 46, 1837.
- 64 CLEVE (P.T.). — Sur les produits d'oxydation de l'acide cholalique. *Bull. Soc. Chim.*, 1881, 35, 373 et 429.
- 65 COOK (F.C.). — Partition of the nitrogen of plant, yeast and meat extracts. *J. Amer. chem. Soc.*, 1914, 36, 1551.
- 66 COPEMANN (M.) et WINSTON (W.B.). — Observations on human bile obtained from a case of biliary fistula. *Journ. of Physiol.*, 1889, 10, 213.
- 67 COQUELET (O.). — La réaction furfurol-sulfurique. *C.R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 747.
- 68 COQUELET (O.). — Microdosage colorimétrique du cholestérol. *C.R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 749.
- 69 COQUELET (O.). — Microdosage colorimétrique des sels biliaires. *C.R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 1815.
- 70 CROFTAN (A.-C.). — *Amer. Journ. Med. Assoc.*, 1902, 123, 150. (D'après Foster et Hooper) [97].
- 71 CUNY (L.). — Dosage colorimétrique de l'azote non protéique du sérum. *Journ. Pharm. Chim.*, 1926, (8), 3, 150.
- 72 CUNY (L.). — La constitution moléculaire du cholestérol et la chimie des acides biliaires. *Journ. Pharm. Chim.*, 1928, (8), 8, 18 et 62.
- 73 CYTRONBERG (S.). — Etude sur le taux de l'azote résiduel du contenu duodénal dans les affections rénales avec azotémie. *Presse Médicale*, 21 novembre 1925. (D'après *Polskie Archiwum Medycyny Wornetrznej*, 1925, 2, 65 et 111.)
- 74 CZYHLARZ (E. von), FUCHS (A.) et FURTH (O. von). — Über die analytische Zusammensetzung der menschlichen Galle. *Biochem. Ztschr.*, 1913, 49, 120.
- 75 DASTRE (A.). — Article Bile in *Dictionnaire de Physiologie de Ch. Richet*, 1897, T. II, 144 (Alcan).
- 76 DELAVILLE (M.) et JONES (C.-M.). — Dosage de l'acide urique dans le sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, 7, 785.
- 77 DEMARCAY (H.). — De la nature de la bile. *Ann. Chim. Phys.*, 1838, 67, 177.
- 78 DENIGÈS (G.). — Généralisation de la réaction de Pettenkofer-Mylius. *C.R. Soc. biol.*, 1908, 64, 1065.
- 79 DENIGÈS (G.). — Précis de chimie analytique, 4 Ed., 1913, 74 et 1217 (Maloine).
- 80 DENIS (W.). — Sulfates in blood. *Journ. biol. Chem.*, 1921, 49, 311.
- 81 DERRIEN (E.) et FONTÈS (G.). — Chimie biologique médicale, 2^e Ed., 1926, p. 128 (Baillière).
- 82 DOUMER (E. et E.). — Loi de l'abaissement de la tension superficielle de l'eau distillée par le glycocholate de soude. *C.R. Soc. Biol.*, 1921, 84, 393.

- 83 DRAGGENDORFF. — Auffindung der Gallensäuren im Harn. *Ztschr. anal. Chem.*, 1869, 8, 102 (d'après *Repert. Pharm.*, 17, 157).
 - 84 DRECHSEL (E.). — Eine Modification der Pettenkoferschen Reaktion auf Gallensäuren. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1881, 24, 45.
 - 85 DRECHSEL (E.). — Ueber die Anwendung von Phosphorsäure anstatt Schwefelsäure bei der Pettenkoferschen Reaktion auf Gallensäuren. *J. f. prakt. Chem.*, 1883, 27, 424.
 - 86 EDGAR (S.-H.). — The determination of amino acids in blood. A note on Folin's method. *Biochem. Journ.*, 1928, 28, 162.
 - 87 EMICH (F.). — Über das Verhalten der Rindsgalle zu der Hüfner'schen Reaktion und einige Eigenschaften der Glykocholsäure. *Monatsh. f. Chem.*, 1882, 3, 325.
 - 88 FIESSINGER (N.) et WALTER (H.). — L'exploration fonctionnelle du foie et l'insuffisance hépatique, 1925, p. 99 (Masson).
 - 89 FISCHER (H.). — Zur kenntnis der Gallenfarbstoffe. XII Lithocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1911, 73, 234.
 - 90 FLEIG (C.). — Réactions colorées de l'huile de sésame avec les aldéhydes aromatiques. *Bull. Soc. Chim.*, 1908, (4), 3, 984.
 - 91 FLEIG (C.). — Réactions colorées de l'huile de sésame avec les divers sucres. — Réactions comparées des acides biliaires. *Bull. Soc. Chim.*, 1908, (4), 3, 992.
 - 92 FLEURY (P.). — Sur la décomposition catalytique de la solution alcaline d'hypobromite de soude par le sulfate de cuivre. Action antagoniste de l'iode. *Journ. Pharm. Chim.*, 1920, (7), 22, 449.
 - 93 FLEURY (P.) et SUTU (Z.). — Le phosphore organique urinaire ; son dosage. *Journ. Pharm. Chim.*, 1926, (8), 4, 491.
 - 94 FOLIN (O.) et BELL (R.-D.). — Applications of a new reagent for the separation of ammonia I. The colorimetric determination of ammonia in urine. *Journ. Biol. Chem.*, 1917, 29, 329.
 - 95 FOLIN (O.). — A new colorimetric method for the determination of the amino acid nitrogen in blood. *Journ. Biol. Chem.*, 1922, 51, 377.
On colorimetric determination of amino nitrogen in normal urine. *Journ. Biol. Chem.*, 1922, 51, 393.
 - 96 FOREMAN (W.). — Rapid volumetric methods for the estimation of amino acids, organic acids and organic bases. *Biochem Journ.*, 1920, 14, 451.
 - 97 FOSTER (M.-G.) et HOOPER (C.-W.). — The metabolism of bile acids I. A quantitative method for analysis of bile acids in dog's bile. *Journ. Biol. Chem.*, 1919, 38, 355.
 - 98 FOSTER (M.-G.), HOOPER (C.-W.) et WHIPPLE (G.-H.). — III) Administration by stomach of bile, bile acids, taurine and cholic acid to show the influence upon bile acid elimination. *Journ. biol. Chem.*, 1919, 38, 379.
- IV) Origin of taurocholic acid. *Ibid*, 421.
- 99 FRANÇOIS (M.). — Contribution à l'étude des iodures de mercure et de leurs dérivés ammoniés. *Thèse Doctorat Sciences*, Paris, 1901.
Préparation de l'iodeure de mercurammonium à l'état cristallisé. *C.R. Acad. Sc.*, 30 avril 1928.
Etude critique de la notation suivie pour les sels de mercurammonium. *Ann. Chim.*, 1927, 78, (10), 341.
 - 100 FRANÇOIS (M.). — Séparation de l'ammoniaque et des amines. *C.R. Acad. Sc.*, 1907, 164, 568.

- 101 FRANÇOIS (M.) et BLANC (L.-G.). — Méthode de préparation des iodo-mercures d'alcaloïdes à l'état cristallisé. *Bull. Soc. Chim.*, 1922, (4), 31, 1208.
Méthode de préparation de quelques iodo-mercures d'alcaloïdes cristallisés. *Ibid.*, 1304.
- 102 FRENKEL (H.). — La réaction de Haycraft pour la recherche des acides biliaires et sa valeur clinique. *C.R. Soc. Biol.*, 1900, 52, 1086.
FRENKEL (H.) et CLUZET (J.). — La réaction de Haycraft et la tension superficielle. *C.R. Soc. Biol.*, 1900, 52, 1105.
- 103 FRERICHs. — *Ann. f. d. ges. Heilk.*, 1845, 5, 52 (d'après Rosenbloom)
- 104 FRITSCH (R.). — Über den Nachweis von Gallensäuren. *Ztschr. f. anal. Chem.*, 1910, 49, 94.
- 105 FURTH (O. von). — Probleme der physiologische und pathologische Chemie. 1912, I.
- 106 GAD ANDRESEN (R.-L.). — Eine Mikromethode zur Bestimmung von Harnstoff im Blut und organischer Sekreten. *Biochem. Ztschr.*, 1919, 99, 1.
- 107 GAMBILLARD (M.). — Le tubage duodénal en pathologie hépatique. *Thèse Médecine*, Paris, 1924.
- 108 GANS (R.). — Konstitution der Zeolithe, ihre Herstellung und technische Verwendung. *Jahrb. K. preuss. Geolog. Landensanstalt u. Bergakademie*, 1906, p. 63.
- 109 GAUVIN (R.) et SKARZINSKI (V.). — Dosage rapide du soufre sous ses différents états dans les liquides biologiques et en particulier dans l'urine. *Bull. Soc. Chim.*, 1913, (4), 13, 1121.
- 110 GILBERT (A.), CHABROL (E.) et BÉNARD (H.). — La cholémie saline dans les icères. *C.R. Soc. Biol.*, 1920, 83, 1602.
- 111 GOIFFON (R.). — Nouveau procédé de mesure de la tension superficielle. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, 8, 165.
- 112 GOIFFON (R.). — Mesure de la tension superficielle de la bile par la méthode dite d'arrachement. *Arch. tube digestif*, 1925, 712; 1926, 134.
- 113 GOLSE (J.). — Méthode volumétrique de dosage de l'urée. Application à l'urine et plus particulièrement au sang et au liquide céphalo-rachidien. *Bull. Soc. Pharm., Bordeaux*, 1918, 188.
- 114 GOLSE (J.). — Application de la réaction de Nessler à la caractérisation rapide de l'oxycyanure de mercure et à sa recherche dans le cyanure mercurique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1928, 66, 209.
- 115 GOODMAN (E.-H.). — Über den Einfluss der Nahrung auf die Ausscheidung von Gallensäuren und Cholesterin durch die Galle. *Hofm. Beitr. chem. Physiol. Pathol.*, 1907, 9, 91.
- 116 GORUP BEZANEZ. — *Vierteljahresb. f. prakt. Pharmakol.*, 1851, 3, 86. (D'après Rosenbloom).
- 117 GREGORY (R.). — *Proc. of Soc. f. exp. Biol. and Med.*, 1927, 24, 910.
GREGORY (R.) et PASCOE (P.-A.). — The quantitative determination of bile acids by means of a new color reaction and monochromatic light. *Journ. biol. Chem.*, 1929, 83, 35.
- 118 GRIGAUT (A.). — Le cycle de la cholestérinémie. *Thèse Médecine*, Paris, 1913.
- 119 GRIGAUT (A.) et THIERY (J.). — Procédé simplifié de dosage de l'azote non-protéique du sang. *C.R. Soc. Biol.*, 1921, 85, 812.

- 120 GRIGAUT (A.). — Du cholestérol aux acides biliaires. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, 10, 937.
- 121 GUÉRIN (G.). — Sur la réaction de Pettenkofer. *Journ. Pharm. Chim.*, 1908, (6), 28, 54.
- 122 GULBRING (A.). — Über die Taurocholeinsäure der Rindergalle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1905, 45, 448.
- 123 GUNDELACH (C.) et STRECKER (A.). — Untersuchung der Schweinegalle. *Lieb. Ann.*, 1847, 62, 205.
- 124 GUYE et PERROT. — Etude clinique sur l'emploi du compte-gouttes pour la mesure des tensions superficielles. *Arch. sciences phys. et natur. de Genève*, 1899, 8; 1901, 11; 1902, 13; 1903, 15.
- 125 HALLE (W.), LÖEWENSTEIN (E.) et PIBRAM (E.). — Bemerkungen über Farbreaktionen die Triketohydrindenhydrats (Ninhydrin). *Biochem. Ztschr.*, 1913, 55, 357.
- 126 HAMBURGER (H. J.). — Zur Bestimmung der Schwefels im Harn. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1917, 100, 221.
- 127 HAMMARSTEN (O.). — Über Dehydrocholalsäure, ein neue Oxydationsprodukt der Cholalsäure. *Ber chem. Ges.*, 1881, 14, 71.
- 128 HAMMARSTEN (O.). — Über eine neue Gruppe gepaarter Gallensäuren. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1898, 24, 322.
- 129 HAMMARSTEN (O.). — Untersuchungen über die Gallen einiger Polarthiere. 1) Über die Galle des Eisbaren. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1901, 32, 435.
- 130 HAMMARSTEN (O.). — Über die Darstellung kristallisierter Taurocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1904-1905, 43, 127.
- 131 HAMMARSTEN (O.). — Text book of physiol. Chem., 1911, 413 (d'après Rosenbloom).
- 132 HAMMARSTEN (O.). — Untersuchungen über die Gallen einiger Polartiere. III Mitt. Über die Galle des Wallrosses. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1909, 61, 454.
— IV Mitt. Über die Gallen einiger Seehunde. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1910, 68, 109.
- 133 HAMMARSTEN (O.). — Darstellung der Gallensäuren und ihrer wichtigsten Abbauprodukte und ihr Nachweis. *Abderhaldens Handbuch., d. biol. Arbeitsmeth.*, 1922, Abt I, T 6, Hl, 211-249.
- 134 HARDING (V. J.) et McLEAN (R. M.). — A colorimetric method for the estimation of aminoacid α nitrogen. *J. biol. Chem.*, 1915, 20, 217.
- 135 HARDING (V. J.) et McLEAN (R. M.). — A colorimetric method of the estimation of the hydrolysis by pancreatic enzymes. *Journ. biol. Chem.*, 1916, 24, 503.
- 136 HARRIS (L. J.). — The titration of amino and carboxyl groups in aminoacids, polypeptides etc. *Proc. Roy. Soc. (B)*, 1924, 95, 440, 500.
— The combination of protein, aminoacids etc. with acids and alkalis and the combined weights as determined by physicochemical measurements. *Proc. Roy. Soc. (B)*, 1925, 97, 364.
- 137 HEINTZ (W.) et WISLICENUS (J.). — Über die Gänsegalle und die Zusammensetzung der Taurochenocholsäure. *Poggend. Ann.*, 1859, 108, 547.
- 138 HENRIQUES (V.). — Über quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Harn. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1909, 60, 1.
- 139 HENRIQUES (V.) et SÖRENSEN (S. P. L.). — Über die quantitative Bestimmung der Aminosäuren, Polypeptiden und der Hippursäure im Harn durch Formoltitration. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1909, 63, 27; 1910, 64, 120.

- 140 HERTER (C. A.) et FOSTER (M. L.). — A method for the quantitative determination of indol. *Journ. biol. Chem.*, 1905-06, 1, 257.
- 141 HERZFELD (E.). — Versuche mit Triketohvdridenhydrat. Eine Methode sur quantitativen Bestimmung der $\text{NH}^2\text{-COOH}$ Gruppe. *Biochem. Ztschr.*, 1914, 59, 249.
- 142 HERZFELD (E.) et HAEMMERLI (A.). — Die Galle im Stoffwechsel. *Schweiz. Med. Woch.*, 1924, n° 6, 141.
- 143 HOOVER (C. F.) et BLANKENHORN (M. A.). — Dissociated jaundice. *Arch. int. Med.*, 1916, 18, 289.
- 144 HOPPE-SEYLER (F.). — Über die Zirkumpolarisations-verhältnisse der Gallensäuren und ihrer Zersetzungsprodukte. *J. f. prakt. Chem.*, 1863, 89, 257.
- 145 HOPPE-SEYLER (F.). — Zur Analyse der Galle. *J. f. prakt. Chem.*, 1863, 89, 281.
- 146 HOPPE-SEYLER (F.). — Physiologische Chemie, 1877-1881, 229 et 301. (Cité par Rosenbloom.)
- 147 HOPPE-SEYLER (F.). — Handbuch der physiologisch und pathologisch chemischen Analyse, 8° éd., 1909. Berlin (Hirschwald).
- 148 HUFNER (G.). — Schnelle Darstellung von Glykocholsäure. *J. f. prakt. Chem.*, 1874, 10, 267.
- 149 HUFNER (G.). — Zur Chemie der Galle. I) Statistichen über die Sekretion der Glykocholsäure. II) Über die Trennung einiger wichtigen Gallenbestandtheile von einander. *J. f. prakt. Chem.*, 1879, 19, 302.
— Weitere Beiträge zur Chemie der Galle. *J. f. prakt. Chem.*, 1882, 25, 97.
- 150 HUPPERT. — *Arch. Heilkunde*, 1864, 5, 236 (d'après Foster et Hooper).
- 151 INOUE (L.) et ITO (H.). — Ueber eine Farben- und Spektralreaktion der Gallensäuren mit Vanillin und Schwefelsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1908, 57, 313.
- 152 JACOBOWITSCH. — *Jahrb. f. Kindeheilk.*, 1886, 24, 373 (d'après Rosenbloom).
- 153 JACOBSEN (O.). — Untersuchung menschlicher Galle. *Ber. chem. Ges.*, 1873, 6, 1026.
- 154 JANSEN (B. C. P.). — Zur Konstitutionsaufklärung der Cholsäure vermittelt Bromierungsversuche. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1912, 82, 326.
- 155 JENKE (M.). — Über die Herkunft der Gallensäuren. I. Mitt. Methodik der Bestimmung der Gallensäuren, der Cholesterins und der übrigen Unverseifbaren in der Hundegalle. *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm.*, 1928, 130, 280.
- 156 JESSEN-HANSEN (H.). — Die Formoltitration. *Abderhaldens Handbuch. d. biolog. Arbeitsmeth.*, 1923, Abt I, T. 7, 245.
- 157 JOLIN (S.). — Über die Säuren der Schweinegalle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1889, 12, 512 et 13, 205.
- 158 JOLLES (A.). — Ueber eine neue Gallensäurenreaktion und ueber den Nachweis der Gallensäuren im Harn. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1908, 57, 30.
— Über den Nachweis von Gallensäuren. *Ber. chem. Ges.*, 1908, 41, 2766.
— Ueber eine neue Gallensäurenreaktion und über den Nachweis der Gallensäuren im Harn. *Chemik. Ztg.*, 1908, 32, 917.
- 159 KIPPING (S.). — α -Hydrindone and its derivatives. *Chem. Soc.*, 1894, 65, 480.

- 160 KOBER (P. A.) et SUGIURA (K.). — A microchemical method of the determination of α and β aminoacids and certain derivatives in proteolysis, blood and urine. *J. Amer. Soc.*, 1913, 35, 1546.
- 161 KÖNIG. — Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmitt., 4 éd., 3, 274 (d'après Van Slyke [289]).
- 162 KUFFERATH. — Über die Anwesenheit der Gallensäuren im Blute nach dem Verschluss des Gallen- und des Milchbrustganges. *Arch. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.)*, 1880, 92.
- 163 KULZ. — Zur Pettenkoferschen Gallensäure Reaktion. *Centrallblatt. f. d. med. Wissch.*, 1875, 515 (in *Ztschr. f. anal. Chem.*, 1876, 15, 106).
- 164 LABBÉ (H.) et VITRY (G.). — Les sulfo-éthers dans la bile et dans les matières fécales. *C. R. Soc. Biol.*, 1907, 62, 1093.
- 165 LANGHELD (K.). — Über die Bestandteile der Rindergalle. *Ber. chem. Ges.*, 1908, 41, 378.
- 166 LASSAR-COHN. — Ueber die Cholsäure und einige Derivate derselben. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1892, 16, 488.
- 167 LASSAR-COHN. — Zur Kenntniss der Säuren der Rindergalle und ihrer Mengenverhältnisse. *Ber. chem. Ges.*, 1893, 26, (1), 146.
- 168 LASSAR-COHN. — Die Säuren der menschlichen Galle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1894, 19, 563.
- 169 LATSCHINOFF (P.). — Über eine der Cholsäure analoge Säure. *Ber. chem. Ges.*, 1885, 18, 3039.
 — Über die Choleinsäure. *Ibid.*, 1886, 19, 1140.
 — Über die Gallensäuren. *Ibid.*, 1887, 20, 1043.
 — Über die Kristallform der Choleinsäure. *Ibid.*, 1887, 20, 1053.
- 170 LATSCHINOFF (P.). — Über ein bemerkwerthes Oxydationsprodukt der Cholsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1879, 12, 1518.
- 171 LATSCHINOFF (P.). — Über die Isocholsäure und Isobiliansäure. *Ber. chem. Ges.*, 1886, 19, 1529.
- 172 LEHMANN (C. C.). — Lehrbuch der physiologischen Chemie, 2^e éd., 1850, I, 232 (d'après Aldrich et Bledsoe).
- 173 LEMATTE (L.), BOINOT (G.) et KAHANE (E.). — Dosage des minéraux contenus dans les principaux organes utilisés en opothérapie. *Journ. Pharm. Chim.*, 1927, (8), 5, 325 et 361.
- 174 LETSCHE (E.). — Einige Bemerkungen über Glykocholsäure und Paraglykocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1909, 60, 462.
- 175 LETSCHE (E.). — Glykocholsäure und Paraglykocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1911, 73, 308.
- 176 LEPEHNE (G.). — Über Leberfunktionsprüfungen. *Münch. med. Woch.*, 1922, N^o 10, 342.
 — Vergleichende Untersuchungen über den Bilirubin- und Gallensäurestoffwechsel beim Lebergesunden, Leberkranken und Neugeborenen. *Klin. Woch.*, 1922, N^o 41, 2031.
- 177 LEPEHNE (G.). — Neuere Methoden zur Prüfung der Leberfunktion. *Abderhaldens Handbuch d. biolog. Arbeitsmeth.*, 1926, Abt IV, T. 6, 989-1048.
- 178 LEVENE (P. A.) et VAN SLYKE (D. D.). — Gazometric determination of free and conjugated aminoacids in the urine. *Journ. biol. Chem.*, 1912, 12, 301.
- 179 LESURE (A.) et DUNEZ (A.). — Dosage du soufre dans le sang et dans les produits biologiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, 10, 879.

- 180 LESURE (A.) et DUNEZ (A.). — Dosage du soufre dans le sang et dans les produits organiques (note complémentaire). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, 11, 600.
- 181 LEWIS (W. C. M.). — On variations observed in the composition of sodium glycocholate prepared by different method. *Biochem. Journ.*, 1908, 3, 119.
- 182 LIBERT (E.). — Le tubage duodénal. *Thèse Médecine*, Paris, 1924.
- 183 LICHT (H.). — Untersuchungen über den Einfluss der Bakterien auf die Gallensäuren. *Biochem. Ztschr.*, 1924, 153, 159.
- 184 LÖB (W.). — Über das Verhalten des Formamids unter der Wirkung des stillen Entladung. Ein Beitrag zur Frage der Stickstoffassimilation. *Ber. chem. Ges.*, 1913, 46, 684.
- 185 LONG (L. H.) et GEPHART (F.). — On the behavior of lecithin with bile salts and the occurrence of lecithin in bile. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1908, 30, 1312.
- 186 LONG (L. H.) et JOHNSON (W. A.). — The purity of commercial bile salts. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1909, 53, 1412.
- 187 McCLURE (C. W.), HUNTSINGER (M. E.) et MONTAGUE (O. C.). — Studies in liver function. Methods for determining the furfural number and the bilirubin concentration of duodenal contents. *Boston med. and surg. Journ.*, 1925, 193, 1050.
— McCLURE (C. W.), VANCE (E.) et GREENE (M. C.). — Methods for determining the concentration of bile acids and of pigments in duodenal contents. *Ibid.*, 1925, 192, 431.
- 188 MAILLARD (L.) et WUNSCHENDORFF (H.). — Méthode de désalbumination par les aluns. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, 251.
- 189 MALFATTI (H.). — Die Formoltitration der Aminosäuren im Harne. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1909, 61, 499.
- 190 MARSHALL (J.). — Über die Hüfnersche Reaktion bei amerikanischer Ochsen-galle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1887, 11, 234.
- 191 MARSHALL (E. K.) et DAVIS (D. M.). — Urea; its distribution in and elimination from the body. *Journ. biol. Chem.*, 1914, 18, 53.
- 192 MARTENS (R.). — Considérations sur le dosage séparé des acides aminés et des polypeptides dans les produits de digestion des protéines. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, 9, 454.
- 193 MARTENS (R.). — Contribution à l'étude de l'azote peptidique du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, 10, 1336.
- 194 MAUBAN. — Le liquide duodénal extrait par tubage direct. *Revue de Médecine*, mars 1921.
- 195 MEDWEDEW (A.). — Darstellung der Glykocholsäure aus Rindergalle. *Zentralbl. f. Physiol.*, 1901, 14, 289.
- 196 MEILLÈRE (G.). — Recherche et caractérisation des acides biliaires dans l'urine. *C. R. Soc. Biol.*, 2 mai 1913.
- 197 MEILLÈRE (G.). — C. R. Séances de la Société de Pharmacie. *Journ. Pharm. Chim.*, 1913, (7), 7, 179.
- 198 MENZIES (J. A.). — Observations on the secretion and composition of human bile. *Biochem. Journ.*, 1912, 6, 210.
- 199 MESTREZAT (W.). — Formoltitration des acides aminés en solution aqueuse et dans l'urine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1919, 1, 107.
- 200 MEYER (E. C.). — Eine Methode zur Bestimmung der Gallensäuren im Duodenalsaft. *Biochem. Ztschr.*, 1923, 140, 356.

- 201 MICHAELIS (L.). — Manuel de techniques de physicochimie (Trad. Chabanier-Lobo-Onell), 1925 (Masson).
- 202 MOLESCHOT (J.). — Bilin im Blute. *Ztschr. ration. Med.*, 1847, 7, 387.
- 203 MOREL (A.). — Précis de technique chimique, p. 626, 1909 (Doin).
- 204 MÖRNER. — *Skand. Arch.*, 1895, 6, 371 ; d'après Neubauer-Huppert. *Analyse des Harns*, 1913.
- 205 MÜLLER (H.). — Untersuchungen über die Braubarkeit der Hay Probe beim Nachweis der Gallensäuren im Urin. *Schweiz. med. Woch.*, 1921, N° 36, 821.
- 206 MYLIUS (F.). — Über die Cholsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1886, 19, 369 ; 1887, 20, 1968.
- 207 MYLIUS (F.). — Zur Kenntniss der Pettenkoferschen Reaktion. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1887, 11, 492.
- 208 MYLIUS (F.). — Über die Blau-Iodstarke und die Blau-Iodcholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1887, 11, 306.
- 209 NEUBERG (C.) et RAUCHWERGER (D.). — Über eine neue Reaktion auf Cholesterin. *Festschrift für E. Salkowski*, 1904 (d'après *Chem. Zentr.*, 1904, 2, 1345).
- 210 NEUBERG (C.). — Kleinere Mitteilungen verschiedenen Inhalts. *Biochem. Ztschr.*, 1913, 56, 495.
- 211 NEUBERG (C.). — Über die Reaktion der Gallensäuren mit Rhamnose bzw. δ -methylfurfurol. *Biochem. Ztschr.*, 1908, 14, 349.
- 212 NEUKOMM (J.). — Über die Nachweisung der Gallensäuren und die Umwandlung derselben in der Blutbahn. *Ann. Chem.*, 1860, 116, 30.
- 213 NICLOUX (M.). — Méthode générale de dosage de l'acide carbonique et des carbonates en solution. Application au dosage de l'acide carbonique dans le sang total, le plasma et le sérum, les globules, la bile, l'urine, les eaux minérales, etc. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, 9, 758.
- 214 OETTINGEN (W. F. von) et SOLLMANN (T.). — On the action of mercuric chloride and of hydrogen dioxide on bile pigments. *Journ. biol. Chem.*, 1927, 72, 635.
- 215 OPPENHEIMER. — Handbuch der Biochemie des Menschen und der Thiere. Tome III. Die Drüsen und die Abscheidungen. Die Galle, p. 202.
- 216 PANZER (Th.). — Über Latschinoffs Cholekämpfersäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1906, 48, 192.
- 217 PANZER (Th.). — Energische Oxydation der Cholsäure mit Salpetersäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1909, 60, 376.
- 218 PARKE (J.). — Über die Taurocholsäure. *Medizinische-Chemische Untersuchungen Hoppe-Seyler*, 1866, 1^{er} cah., p. 160.
- 219 PATON et BALFOUR. — *Laboratory Reports of Royal College of Physicians*. Edimbourg, 1891, 3, 191 (d'après Rosenbloom).
- 220 PERLZWEIG (W. A.) et BARRON (E. G.). — New colorimetric method for determination of bile acids in blood. *Proc. Soc. exp. Biolog. Med.*, 1926, 24, 233.
- 221 PETREN (G.). — Untersuchungen über die Blutgerinnung bei Ikterus. *Beitr. klin. Chirug.*, 1920, 120, 501.
- 222 PETTENKOFER (M. J.). — Notiz über eine neue Reaktion auf Gallen und Zucker. *Ann. Chem. Pharm.*, 1844, 52, 90.
- 223 PHILIBERT (J.). — L'urée, l'ammoniaque et les amino-acides urinaires au point de vue analytique. *Thèse Doctorat Pharmacie*, Paris, 1920.

- 224 PIETTRE (M.). — Sur l'acide glycocholique. *C. R. Acad. Sc.*, 1908, 147, 810.
- 225 PIETTRE (M.). — Traitement chimique de la bile. Séparation des acides biliaires. *C. R. Acad. Sc.*, 1909, 148, 372.
- 226 PIETTRE (M.). — Sur les acides cholaliques. *C. R. Acad. Sc.*, 1909, 148, 1779.
- 227 PINCUSOHN (L.). — *Medizinisch-chemisches Laboratoriums-Hilfsbuch.*, Leipzig, 1912 (Vogel).
- 228 POHERECKA-LELECZ (B.). — Sur le microdosage de l'urée et des sels ammoniacaux par titration de l'hypobromite. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1924, 6, 773.
- 229 POHERECKA-LELECZ (B.). — Microdosage simultané de l'urée et de l'ammoniaque (procédé à la zéolithe synthétique ; permutite). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1926, 8, 178.
- 230 POHERECKA-LELECZ (B.). — Dosage microvolumétrique du soufre dans les liquides biologiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, 9, 263.
- 231 POTTER (R. S.) et SNYDER (R. S.). — The aminoacid nitrogen of soil. *J. Ind. Engin. Chem.*, 1915, 7, 1049.
- 232 PREGL (F.). — Über die Darstellung und einige Reaktionen der Cholsäure. *Arch. f. d. ges. Physiol.*, 1898, 71, 303.
- 233 PREGL (F.). — Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. *Monatsh. f. Chem.*, 1903, 24, 19.
- 234 PREGL (F.). — Über die gemeinsame Konstitution der drei spezifischen Gallensäuren. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1910, 65, 157.
- 235 PREGL (F.) et BUCHTALA (H.). — Erfahrungen über die Isolierung der spezifischen Gallensäuren. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1911, 74, 198.
- 236 PRINGSHEIM (H.). — Über ein neues Oxydationsprodukt der Cholsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1915, 48, 1324.
- 237 RAMANN (E.) et SPRENGEL (A.). — Der Basenaustausch der Silikate. *Ztschr. f. anorg. u. allgem. Chem.*, 1913, 105, 81.
- 238 RAMANN (E.), MÜRZ (S.), BIERENBERGER (U.) et SPRENGEL (A.). — Ueber den Basenaustausch der Silikate. *Ztschr. f. anorg. u. allgem. Chem.*, 1916, 95, 115.
- 239 RAUE (F.). — Über den Gallensäurestoffwechsel. I) Eine neue Methode zur quantitativen Schätzung der Gallensäuren. *Ztschr. f. klin. Méd.*, 1925, 102, 79.
- 240 ROBSON (A. W. M.). — Observations on the secretion of bile in a case of biliary fistula. *Proc. of. Roy. Soc.*, 1890, 47, 499.
- 241 ROGER (F.). — Physiologie du foie, in *Traité de physiologie normale et pathologique*, Paris, 1928, tome III (Masson).
- 242 RONCERAY. — Contribution à l'étude des lichens à oricine. *Thèse Doctorat Pharmacie*, Paris, 1904.
- 243 RONCHÈSE (A. D.). — Méthodes de dosage de quelques composés azotés. *Thèse Doctorat Pharmacie*, Paris, 1908.
- 244 ROSENBLOOM (J.). — A quantitative analysis of human bile. *Journ. biol. Chem.*, 1913, 14, 241.
- 245 ROSENTHAL (F.) et VON FALKENHAUSEN (F.). — Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Gallensekretion. I Mitt. Ueber eine quantitative Bestimmung der Gallensäuren in der menschlichen Duodenalgalie. *Arch. f. experim. Physiol. u. Pharmakol.*, 1923, 98, 321.

- 246 ROSENTHAL (F.) et LAUTERBACH (Fr.). — IV Mitt. Ueber eine quantitative kolorimetrische Bestimmung der Gallensäuren in menschlichen Körperflüssigkeiten. *Archiv. f. experim. Physiol. u. Pharmakol.*, 1924, 101, 1.
- 247 ROSENTHAL (F.) et WISLICKI (L.). — Ueber eine quantitative Bestimmung der Gallensäuren im Blut. *Archiv. f. experim. Physiol. u. Pharmakol.*, 1926, 117, 8.
- 248 ROTHMUND (V.) et KORNFIELD (G.). — Der Basenaustausch im Permutit. *Ztschr. anorg. u. allgem. Chem.*, 1918, 103, 129.
- 249 RUHEMANN (S.). — Triketohydrindenhydrat. *Chem. Soc.*, 1910, 97, 2025.
- 250 RUHEMANN (S.). — Cyclic di- and triketones. *Chem. Soc.*, 1911, 99, 1438.
- 251 RUHEMANN (S.). — Triketohydrindenhydrat, the analogues of uramil and purpuric acids. *Chem. Soc.*, 1911, 99, 1486.
- 252 SACHS (R.) et KORMANN (W.). — Ueber eine Methode zur quantitativen Bestimmung einiger Amide mittels salpetriger Säure. *Landwirthsch. Vers. Stat.*, 17, 321, d'après *Ztschr. f. anal. Chem.*, 1875, 14, 380.
- 253 SALKOWSKI (E.). — Über die Entstehung und Ausscheidung der Oxalsäure. *Berl. klin. Woch.*, 1900, N° 20.
- 254 SALKOWSKI (E.). — Über eine Ausscheidung von palmitinsäurem Kalk aus Rindergalle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1916, 97, 210.
- 255 SCHADE (Von). — *Verh. d. Kongress. f. inn. Med.*, 1922 (d'après Lepehne [177]).
- 256 SCHEMENSKY (W.). — Untersuchungen über die Oberflächenspannung des Urins und ihre Anwendung auf die klinische Pathologie. *Biochem. Ztschr.*, 1920, 105, 229.
- 257 SCHENCK (S. L.). — Die modifizierte Pettenkofer'schen Gallenproben. *Jahr. f. Thier. Chem.*, 1872, 2, 232.
- 258 SCHENCK (M.). — Zur Kenntnis der Gallensäuren. I. Vorläufige Mitt. Electrolytische Reduktion der Dehydrocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1909, 63, 308.
— II Mitt. *Ibid.*, 1910, 69, 383.
- 259 SCHENCK (M.). — III Mitt. Über die Formel der Ciliansäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1913, 87, 59.
- 260 SCHENCK (M.). — VII Mitt. Oxydation der Biliansäure mit Salpetersäure. Biloidansäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1920, 110, 167.
— VIII Mitt. *Ibid.*, 1920, 112, 38.
- 261 SCHENCK (M.). — IX Mitt. Dioxime der α -Diketocholansäure und seine Umlagerung. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1923, 128, 53.
- 262 SCHENCK (M.). — X Mitt. I) Amid der Desoxycholsäure. II) Notiz betreffend die Formel der Biloidansäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1923, 131, 269.
- 263 SCHENCK (M.). — Über das Vorkommen von Desoxycholsäure (Choleinsäure) in der verseiften Schafgalle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1925, 148, 218.
- 264 SCHENCK (M.). — I) Über Bilisoidansäure. II) Einwirkung von Zinkstaub und Eisessig auf Dichloromonodesoxybiliansäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1924, 139, 39.
- 265 SCHENCK (M.) et KIRCHOFF (H.). — XVII Mitt. II) Über das Verhalten der Bilisoidansäure gegen Natronlauge. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1927, 169, 164.
- 266 SCHENCK (M.) et KIRCHOFF (H.). — Electroreduktion der Dehydrodesoxycholsäure; Oxyketocholansäure. Überführung des Reaktionsproduktes in 7 Ketocholansäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1927, 163, 120.

- 267 SCHENCK (M.). — XVI Mitt. Über stickstoffhaltige Abkömmlinge der Desoxybilansäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1927, 166, 142.
— SCHENCK et KIRCHOFF. — XVIII Mitt. Über stickstoffhaltige Derivate der Isodesoxy- und Isobilansäure. *Ibid.*, 1927, 172, 159.
— XIX Mitt. Über einige Versuche mit der Umlagerungsprodukten der Dioxime der Bilansäure und Isobilansäure. *Ibid.*, 1928, 174, 135.
— XX Mitt. Über stickstoffhaltige Derivate der Bilansäure. *Ibid.*, 1928, 176, 1928.
— XXI Mitt. Weitere Untersuchungen über stickstoffhaltige Abkömmlinge der Bilansäure. *Ibid.*, 1928, 177, 280.
— XXII Mitt. Zur Charakterisierung einiger Oxime und Oximumlagerungsprodukte. *Ibid.*, 1929, 180, 107.
- 268 SCHIFF (H.). — Über Methylensasparagine. *Lieb. Annal.*, 1899, 310, 25.
— Trennung von Amin- und Säurefunktion im Lösungen von Aminosäuren mittels Formaldehyd. *Ibid.*, 1901, 319, 59.
— Trennung von Amin- und Säurefunktion im Lösungen von Aminosäuren *Ibid.*, 1901, 319, 287.
— Trennung von Amin- und Säurefunktion mittels Formaldehyd. *Ibid.*, 1902, 325, 348.
- 269 SCHMIDT (C. L. A.) et DART (A. E.). — The estimation of bile acids in bile. *Journ. biol. Chem.*, 1920-21, 45, 415.
- 270 SCHMIDT (C. L. A.) et MERRILL (J. A.). — The estimation of bile acids in urin. *Journ. biol. Chem.*, 1923-24, 58, 601.
- 271 SCHOTTEN (C.). — Zur Kenntniss der Gallensäuren. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1886, 10, 175.
— Ueber die Säuren der menschlichen Galle, *Ibid*, 1887, 11, 268.
- 272 SCHULTZE. — Die Ionendiffusion im Permutit und Natrolith. *Ztschr. physikal. Chem.*, 1914, 89, 168.
- 273 SOKOLOFF (N.). — Ein Beitrag zur Kenntniss der Lebersekretion. *Arch. ges. Physiol.*, 1875, 11, 166.
- 274 SÖRENSEN (S. P. L.). — Enzymstudien. I. Formoltitrierung. *Biochem. Ztsch.*, 1907, 7, 45.
— Bemerkungen über die Formoltitrierung, insbesondere über die Anwendung von Natronlauge oder Barytlauge bei derselben. *Ibid.*, 1910, 25, 1.
- 275 SÖRENSEN (S. P. L.). et JESSEN-HANSEN (H.). — Über die Ausführung der Formoltitrierung in starkfarbigen Flüssigkeiten. *Biochem. Ztschr.*, 1907, 7, 407.
- 276 SPIRO. — *Arch. Physiol. Du Bois Reymond*, 1880, sup. vol., p. 50.
- 277 STADELMANN (A. W.). — *Der Ikterus*, Stuttgart, 1891.
- 278 STÄDELER (G.). — Ein einfaches Verfahren zur Darstellung von kristallisierter Galle. *Journ. prak. Chem.*, 1857, 72, 257.
- 279 STRECKER (A.). — Untersuchung der Ochsen-galle. Erste Abhandlung. *Lieb. Ann.*, 1848, 65, 1.
- 280 STRECKER (A.). — Vorläufige Notiz über die Spaltung der Cholsäure in Glycocol und stickstofffreie Säuren. *Lieb. Ann.*, 1848, 65, 130.
- 281 SZILARD (P.). — Eine neue kolorimetrische Method zur quantitativen Bestimmung der Gallensäuren-Saltze im Blute. *Biochem. Ztschr.*, 1926, 173, 440.
- 282 TASHIRO (S.). — Determination of bile salts in the blood. Preliminary report. *Cincinnati J. Med.*, 1923, 4, 197.

- 283 THEYER (J.) et SCHLOSSER (Th.). — Beitrage zur Kenntniss der Galle und deren Zersetzungsproducte. *Lieb. Ann.*, 1844, 50, 235.
- 284 THOMAS (P.). — Sur une réaction colorée de l'ammoniaque. *Bull. Soc. Chim.*, 1912, (4), 11, 796.
- 285 TRAUBE (J.). — Capillaranalyse. *Abderhaldens Handl. biolog. Arbeitsmet.*, 1928, Abt III, T A 1, 878.
- 286 TRIFANOWSKI (D.). — Ueber die Zusammensetzung der menschlichen Galle. *Arch. ges. Physiol.*, 1874, 9, 492.
- 287 UDRANSKY (L. von). — Ueber Furfurolreaktionen. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1888, 12, 351.
- 288 VAHRAM-ACHOD (T.). — Des sels biliaires et de leurs réactions. *Thèse Médecine*, Paris, 1925.
- 289 VAN SLYKE (D. D.). — Die gazometrische Bestimmung von primären aliphatischen Aminostickstoff und ihre Anwendung auf physiologisch-chemischen Gebiete. *Abderhaldens Handbuch biolog. Arbeitsmeth.*, 1923, Abt I, T 7, 263.
- 290 VAN SLYKE (D. D.). — Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen, einige Anwendungen derselben in der Chemie der Proteine, des Harns und der Enzyme. *Ber. chem. Ges.*, 1910, 43, 3170.
— A method for quantitative determination of aliphatic aminogroups *Journ. biol. Chem.*, 1911, 9, 185.
— The quantitative determination of aliphatic aminogroups. *Ibid.*, 1912, 12, 275.
- 291 L. G. — Dosage des acides aminés par la méthode de Van Slyke. *Journ. Pharm. Chim.*, 1920, (7), 21, 28.
- 292 VAN SLYKE (D. D.). — The gazometric determination of the aliphatic aminonitrogen in minute quantities. *Journ. biol. Chem.*, 1913-14, 16, 121.
— Note on the micromethod for the determination of aliphatic aminonitrogen. *Ibid.*, 1915, 23, 407.
- 293 VERNON STEILE (J.) et KAHLENBERG (L.). — A new method for identification and estimation of cholesterol and certain other compounds. *Journ. biol. Chem.*, 1926, 67, 425.
- 294 VILLE (J.). — Sur la réaction de Pettenkofer pour la recherche des sels biliaires. *Bull. Soc. Chim.*, 1907, (4), 1, 965.
- 295 VILLE (J.) et DERRIEN (E.). — Réactions colorées des acides biliaires avec la vanilline et avec l'aldéhyde anisique. *C. R. Soc. Biol.*, 1908, 64, 905
- 296 VILLE (J.) et DERRIEN (E.). — Réactions colorées des acides biliaires avec les aldéhydes furaniques. Véritable mécanisme de la réaction de Pettenkofer, 1909, 66, 175.
- 297 VILLE (J.). — Sensibilité de la réaction indiquée par Mylius pour caractériser l'acide cholalique et le distinguer des acides biliaires proprement dits. *Bull. Soc. Chim.*, 1913, (4), 13, 866.
- 298 VITALI (D.). — *L'orosi*, 15, 42, d'après *Ztschr. analyt. Chem.*, 1892, 31, 725.
— Contributo alla ricerca della bile nelle urina. *Rendiconto della R. Accademia de Scienza*, Bologne, 1892, 54.
- 299 WAHLGREEN (V.). — Uber Glykocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1902, 36, 556.
- 300 WEBER (J.) et KRANE (W.). — Mikromethoden zur Ammoniakbestimmung im Harn. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1927, 165, 45.

- 301 WHITE (S. M.). — The preparation of the unconjugated acids of ox-bile. *Biochem. Journ.*, 1929, 23, 1165.
- 302 WHITEHORN (J. C.). — « Permutit » as reagent for amines. *Journ. biol. Chem.*, 1923, 56, 751.
- 303 WIELAND (H.) et WEIL (Fr.). — Untersuchungen über die Cholsäure. — I Mitt. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1912, 90, 287.
- 304 WIELAND (H.) et SORGE (H.). — Untersuchungen über die Gallensäuren. II Mitt. Zur Kenntniss der Choleinsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1916, 97, 1.
- 305 WIELAND (H.) et STENDER (H.). — IV Mitt. Die Synthese der Glykodesoxycholsäure und der Taurodesoxycholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1919, 106, 181.
- 306 WIELAND (H.) et BOERSCH (E.). — V Mitt. Die Reduktion der Dehydrocholsäure und der Dehydrodesoxycholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1919, 106, 190.
- 307 WIELAND (H.) et KULENKAMPF (A.). — VI Mitt. Beiträge zur Abbau der Desoxybiliansäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1919, 108, 295.
- 308 WIELAND (H.). — VII Mitt. zur Kenntnis der Choloïdänsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1919, 108, 306.
- 309 WIELAND (H.) et WEYLAND (P.). — VIII Mitt. Zur Kenntnis der Lithocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1920, 110, 123.
- 310 WIELAND (H.) et SCHULENBURG (W.). — X Mitt. Die weitere Abbau der Desoxycholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1921, 114, 167.
- 311 WIELAND (H.) et ALLES (R.). — Über den Giftstoff der Kröte. *Ber. Chem. Ges.*, 1922, 55, 1789.
- 312 WIELAND (H.) et SCHLICHTING (O.). — XI. Mitt. Die Oxydation der Cholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1922, 119, 76.
XIV Mitt. Ciliansäure Ciloidänsäure und Biloïdänsäure. *Ibid*, 1922, 123, 213.
- 313 WIELAND (H.) et ADICKES (F.). — XIII Mitt. Der Abbau der Isodesoxybiliansäure. Ein Beitrag zur Ortbestimmung. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1922, 120, 232.
- 314 WIELAND (H.). — XV Mitt. Über die Pseudochoïdänsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1922, 123, 237.
- 315 WIELAND (H.), HONOLD (E.) et PASCUAL-VILA (J.). — XVII Mitt. Über Isodesoxycholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1923, 130, 326.
- 316 WIELAND (H.) et MOTHES (W.). — XIX Mitt. Über die weitere Oxydation von Brenzdesoxybiliansäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1924, 134, 149.
- 316 bis WIELAND (H.) et SCHLICHTING (O.). — *Ztschr. physiol. Chem.*, 1924, 134, 276.
- 317 WIELAND (H.) et REVEREY (G.). — XXI Mitt. Zur Kenntnis der menschlichen Galle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1924, 140, 186.
- 318 WIELAND (H.) et JACOBI (R.). — XX Mitt. Weiteres über die Zusammensetzung der Galle des Menschen und des Rindes. Zur Konstitution der Anthropodesoxycholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1925, 148, 232.
- 319 WIELAND (H.) et JACOBI (R.). — Die Synthese der Pseudocholestane aus Cholsäure. *Ber. Chem. Ges.*, 1926, 59, 2064.
- 320 WIELAND (H.), SCHLICHTING (O.) et JACOBI (R.). — XXVI Mitt. Über die Natur der Seitenkette und des vierten Ringes. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1926, 161, 80.

- 321 WIELAND (H.). XXVII Mitt. Zur Konstitution der beim Abbau der Cholsäure entstehenden Säuren. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1927, 170, 167.
- 322 WIELAND (H.) et VOCKE (F.). — XXVIII Mitt. Beiträge über die Natur des vierten Ringes. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1928, 177, 68.
- 323 WILLSTAETTER (R.) et WALDSCHMIDT-LEITZ (E.). — Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden. *Ber. chem. Ges.*, 1921, 54, 2988.
- 324 WILLSTAETTER (R.). — Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden. *Abderhaldens Handb. biolog. Arbeitsmeth.*, 1922, Abt. I, T. 7, 289.
- 325 WINDAUS (A.) et NEUKIRCHEN (K.). — Die Umwandlung des Cholesterins in Cholsäure. *Ber. chem. Ges.*, 1919, 52, 1915.
- 326 WINDAUS (A.). — Abbau und Aufbauversuche im Gebiete der Sterine. *Abderhaldens Handb. biolog. Arbeitsmeth.*, 1922, Abt. I, T. 6, 169-210.
- 327 WINDAUS (A.). — Über verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Cholesterin und Gallensäuren. *Ztschr. angew. Chem.*, 1923, 36, 309.
- 328 WINDAUS (A.) et BOHNE (A.). — Über Hyoglycodesoxycholsäure und über Hyodesoxycholsäure. *Lieb. Ann.*, 1923, 433, 278.
- 329 WINDAUS (A.), BOHNE (A.) et SCHWARTZKOPF (E.). — Über die Chenodesoxycholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1924, 140, 167.
- 330 WINDAUS (A.) et HOSSFELD (R.). — Überführung von Cholesterin in 4-Oxyhyocholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1925, 145, 177.
- 331 WINDAUS (A.) et VAN SCHOOR (A.). — Über die Chenodesoxycholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1925, 148, 225.
- 332 WINDAUS (A.) et VAN SCHOOR (A.). — Über die Konstitution der Chenodesoxycholsäure, III. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1926, 157, 177.
- 333 WINDAUS (A.) et VAN SCHOOR (A.). — Über die Bestandteile der Hühnergalle. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1926, 161, 143.
- 334 WINDAUS (A.). — Über die Konstitution der Hyodesoxycholsäure. *Lieb. Ann.*, 1926, 447, 233.
- 335 WINDAUS (A.). — Umlagerung des Cholesterins. *Lieb. Ann.*, 1927, 453, 101.
- 336 WINDAUS (A.) et VAN SCHOOR (A.). — Über die β . Phocaecholsäure. *Ztschr. physiol. Chem.*, 1927, 173, 312.
- 337 WINDISCH (W.) et DIETRICH (W.). — Titrationen mit oberflächenaktiven Stoffen als Indicator. I Mitt. Aciditätsbestimmungen mit den Homologen der Fettsäurereihe. *Biochem. Ztschr.*, 1919, 97, 135.
- 338 WITTELS (F.) et WELWART (N.). — Über den Nachweis von Gallensäuren, Lævulose, Glycuronsäure und Pentosen im Harn. *Chem. Ztg.*, 1909, 33, 1133.
- 339 YEO (G.-F.) et HERROUN (E.-F.). — A note on the composition of human bile obtained from a fistula. *Journ. of Physiol.*, 1884, 5, 116.
- 340 YOUNGBURG (G.-E.). — The removal of ammonia from urine preparatory to the determination of urea. *Journ. biol. Chem.*, 1920-21, 45, 391.
- 341 ZEBROWSKI (B.). — Über die Zusammensetzung der menschlichen Galle in einem Fall einer Fistel der Gallenblase. *Gazeta lekarska* (Warschau), (2), 21, 809, d'après *Maly's Jahrbichte*, 1901, 31, 546.
- 342 ZEYNEK (R. von). — Zur Kenntniss der menschlichen Lebergalle. *Wien. Klin. Woch.*, 1899, n° 21.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
Introduction	7

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

<i>La chimie des acides biliaries</i>	10
I. — Classification des acides biliaries	12
II. — Nomenclature et formules	15
III. — Les dérivés des acides biliaries	17
IV. — Relations entre le cholestérol et les acides biliaries.	26
V. — Conclusions	28

CHAPITRE II

<i>La composition générale de la bile</i>	30
I. — Biles animales	31
II. — Bile humaine (vésicule)	32
III. — Bile humaine (fistule)	33
IV. — Liquide duodénal	34

CHAPITRE III

<i>Isolement de quelques acides et sels biliaries</i>	35
I. — Examen de sels biliaries du commerce	35
II. — Isolement d'acides et sels biliaries	37
1° Acide glycocholique	37
2° Taurocholate de soude	40
3° Acide hyoglycocholique	41
4° Acide cholalique	42
5° Acides désoxycholique et anthropolésoxycholique .	43

DEUXIEME PARTIE

LE DOSAGE DES SELS BILIAIRES

CHAPITRE PREMIER

<i>Méthodes pondérales</i>	44
----------------------------------	----

CHAPITRE II

<i>Méthodes basées sur la mesure de la tension superficielle</i>	47
I. — Procédés utilisant la réaction de Hay	47
II. — Procédé du tube capillaire	48
III. — Procédé de l'arrachement	49
IV. — Procédés stalagmométriques	49

CHAPITRE III

<i>Méthodes utilisant l'hydrolyse alcaline. — Dosage gazométrique</i>	53
I. — Le dosage de l'azote aminé par la méthode de van Slyke	54
II. — Les méthodes antérieures de dosage des sels biliaires	55
1° Technique de Foster et Hooper	55
2° Technique de Schmidt et Dart	56
3° Technique de Rosenthal et von Falkenhausen	56
4° Comparaison de ces trois techniques	57
III. — Etude d'une méthode gazométrique de dosage	57
1° Dosage gazométrique du glycocolle et de la taurine	58
2° Dosage gazométrique des sels biliaires	61
3° Dosage différentiel des sels biliaires dans la bile	64
4° Dosage gazométrique en un temps	76

CHAPITRE IV

<i>Méthodes utilisant l'hydrolyse alcaline. — Dosage colorimétrique</i>	86
I. — La méthode de Rosenthal et Lauterbach	86
II. — Expériences personnelles sur l'emploi de la ninhydrine	90
1° La réaction à la ninhydrine	90
2° Dosage du glycocolle et de la taurine	91
3° Dosage des sels biliaires dans la bile	92

CHAPITRE V

<i>Méthode utilisant l'hydrolyse alcaline. — Dosage volumétrique</i>	94
I. — Dosage par la méthode au formol de petites quantités d'azote aminé	95

	Pages
II. — Dosage des sels biliaires par formol-titration	96
1° Intervention de quelques sels, des acides biliaires et des pigments	97
2° Elimination de l'ammoniaque	99
3° Essais portant sur des solutions de composition connue	103
4° Dosage des sels biliaires dans la bile par formol-titration différentielle	109
5° Dosage par formol-titration en un temps	111

CHAPITRE VI

<i>Méthodes de dosage colorimétriques</i>	114
I. — Les réactions colorées des sels biliaires	114
1° La réaction de Pettenkofer et ses variantes	114
1) La réaction de Pettenkofer	114
2) Les variantes de la réaction	115
3) Spécificité et contrôle spectroscopique	117
4) Mécanisme de la réaction	120
2° Réactions données par les aldéhydes aromatiques ...	121
1) Réactions de Ville et Derrien	121
2) Réaction d'Inouye et Ito	122
3) Réaction de Meillère	122
4) Réaction de Jolles	123
5) Réaction de Mylius à l'iode	123
II. — Le comportement des divers acides biliaires dans les réactions colorées	124
III. — Applications déjà faites de ces réactions au dosage des sels biliaires	126
1° Méthode de Herzfeld et Haemmerli.....	129
2° Méthode de Coquelet	131
3° Méthode de Aldrich et Bledsoe	132
IV. — Etude d'une méthode de dosage	133
1° Etude qualitative de la réaction.....	134
2° Etude quantitative de la réaction.....	139
3° Application à l'analyse de la bile et du liquide duodénal	141
1) Essais d'extraction des sels biliaires....	142
2) Purification des solutions étudiées.....	143
4° Dosage des sels biliaires dans la bile et le liquide duodénal	155

	Pages
5° Résultats donnés par cette méthode.....	157
6° Conclusion	159
CHAPITRE VII	
<i>Méthodes de dosage des sels biliaires sulfurés</i>	160
I. — Méthodes de dosage.....	160
II. — Discussion de ces méthodes.....	162
III. — Etude d'une technique de dosage.....	163
1° Minéralisation du soufre.....	164
2° Dosage de petites quantités d'acide sulfurique par la méthode à la benzidine.....	165
3° Dosage du soufre des sels biliaires.....	167
4° Dosage du soufre dans des biles animales.....	169
IV. — Technique du dosage des sels biliaires sulfurés....	171
CHAPITRE VIII	
<i>Méthodes acidimétrique et polarimétrique</i>	174
CONCLUSION	180
<i>Appendice I. — Tables pour le dosage gazométrique..</i>	185
<i>Appendice II. — Sur la formoltitration du glycolle et de la taurine</i>	188
<i>Appendice III. — Récapitulation des résultats d'analyse de biles animales</i>	194
BIBLIOGRAPHIE	201

